

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

**HILTON TÚLIO LIMA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA TORTA DE MACAÚBA COMO INSUMO PARA  
PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**DIAMANTINA - MG  
2011**

**HILTON TÚLIO LIMA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA TORTA DE MACAÚBA COMO INSUMO PARA  
PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**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  
UFVJM  
2011**

Ficha Catalográfica  
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM  
Bibliotecária: Ieda Maria Silva – CRB-6ª nº 1251

S237a  
2011 Santos, Hilton Túlio Lima dos

Avaliação da torta de macaúba como insumo para produção de bioetanol./Hilton Túlio Lima dos Santos - Diamantina: UFVJM, 2011.

86 p.

Dissertação (Mestrado Química)-Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

1.Macaúba. 2.Sacarificação. 3. Fermentação. 4.Biocombustível  
5.*Pichia stipitis*. I. Título. II. Santos, Alexandre Soares


**CDD: 547**

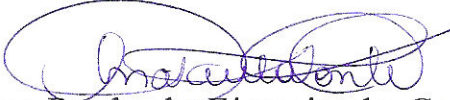
# AVALIAÇÃO DA TORTA DE MACAÚBA COMO INSUMO PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

**Hilton Túlio Lima dos Santos**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química, nível  
de Mestrado, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 04 / 07 / 2011

  
Prof. Reginaldo Ramos de Menezes  
Membro Externo – UFRJ

  
Profa. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela  
Membro Titular – UFVJM

  
Prof. Sandro Luiz Barbosa dos Santos  
Membro Titular – UFVJM

  
Prof. Alexandre Soares dos Santos  
Presidente / Orientador – UFVJM

DIAMANTINA  
2011

*Dedico este trabalho àquelas pessoas que me apoiaram de alguma forma na sua concretização.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por absolutamente tudo em minha vida. Creio que Ele nunca me enviará a um lugar aonde Sua graça não alcançará.

À Vivian Maria Filha e Ana Luiza Lima dos Santos, minha esposa e minha filha, respectivamente, sem as quais esse trabalho não teria começado, nem prosseguido, pois foram elas que nunca me deixaram pensar em desistir

Ao prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos, meu orientador, que me apresentou à área de bioprocessos e me ajudou a ver que o mundo da ciência é infinito. Agradeço também pela paciência (“não é mole não”), pela disponibilidade, pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, enfim meu muito obrigado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lílian de Araújo Pantoja, pelos ensinamentos, conselhos e paciência ao longo desta jornada.

Ao Walter José Ramos dos Santos, meu pai, um homem que me ensinou valores de vida para hoje eu poder ser considerado pai.

À Auristela Virgínia Lima dos Santos, minha mãe, que sempre me deu coragem para seguir em frente

Ao Emanuel Thiago Lima dos Santos, meu irmão, que nunca deixou de acreditar em mim.

Aos colegas e companheiros, do LBBio (Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação), LabVin (Laboratório de Microvinificação e Qualidade de Bebidas), ambos situados na UFVJM, agradeço pela convivência nesse período conturbado, pelos momentos de descontração e suporte nessa jornada, meu muitíssimo obrigado.

Às empresas Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA, Biosep LTDA, ao ICA – Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, a UBCM – Unidade de Beneficiamento do coco de Macaúba e a Fundação André Tosello, que contribuíram com amostras de tortas e microrganismos para a realização deste trabalho

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado.

*“O pensamento cria, o desejo atrai, e a fé constrói”*

*Lauro Trevisan*

## RESUMO

SANTOS, H. T. L. **Avaliação da torta de macaúba como insumo para produção de bioetanol.** UFVJM. Diamantina-MG. 2011, 85p. (Dissertação de Mestrado em Química, área de concentração: Química Orgânica.

Para a manutenção das práticas econômicas e sócio-culturais construídas sobre a exploração e transformação do petróleo, faz-se necessário criar alternativas que não rompam de forma estanque com as práticas industriais hoje vigentes. Nesse contexto, o uso de biomassas para a produção de combustíveis líquidos que alimentem motores à combustão permite sustentar práticas antigas com novos benefícios. Dessa forma, a presente dissertação teve por objetivo avaliar o potencial da torta de macaúba, um coproduto da indústria de óleos vegetais, como insumo para produção de bioetanol. Tal objetivo foi trabalhado através de estudos de sacarificação da torta de macaúba com posterior processo fermentativo. A biomassa em questão foi caracterizada quimicamente, o que indicou a presença de aproximadamente 50% de carboidratos, distribuídos em,  $23,16 \pm 0,95$  % de amido,  $11,49 \pm 1,08$ % de celulose,  $9,6 \pm 0,79$ % de hemicelulose e  $11,48 \pm 0,62$  % de açúcares solúveis. Para a primeira intervenção da despolimerização dos polissacarídeos presentes na torta de macaúba foi realizado um planejamento experimental fatorial  $2^{5-1}$  com 5 fatores e 4 pontos centrais com as seguintes variáveis: concentração de ácido sulfúrico, tempo de pré-tratamento ácido, razão sólido/líquido, concentração de amiloglicosidase e concentração de celulase. Na sequência, o processo de sacarificação foi otimizado com o uso de delineamento composto central rotacional  $2^3$ , com 3 fatores, 4 pontos centrais e 6 pontos axiais, onde foram avaliadas as concentrações de ácido sulfúrico, amiloglicosidase e celulase. Um hidrolisado obtido em condição otimizada com 92% de eficiência foi submetido à destoxificação com carvão ativado e, em seguida, foram realizados ensaios de fermentabilidade conduzidos com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*. A levedura *S. cerevisiae* se mostrou resistente ao hidrolisado não destoxificado, apresentando  $Y_{P/S}$  de 0,49. *P. stipitis* mostrou-se susceptível ao meio não destoxificado, mas foi capaz de converter 99% dos açúcares redutores presentes no meio destoxificado. A torta de macaúba apresentou potencial considerável para produção de bioetanol. A partir dos dados de bancada é possível estimar uma produção de 104l de etanol por tonelada de torta de macaúba.

**Palavras-chaves:** Macaúba, sacarificação, fermentação, bicomcombustível, *Pichia stipitis*.

## ABSTRACT

SANTOS, H. T. L. **Evaluation of the macauba's (macaw palm) coconut cake as an input for production of bioethanol.** UFVJM. Diamantina-MG. 2011, 85p. (Master Thesis in Chemistry, area of concentration: Organic Chemistry).

For the maintenance of economic and socio-cultural practices built on the exploitation and processing of oil it is necessary to create alternatives that do not break so tight with current industrial practices. In this context, the use of biomass to produce liquid fuels that are fed into to combustion engines allows to sustain old practices with new benefits. Thus, this dissertation aimed to evaluate the potential of macaw palm coconut cake, a co-product of vegetable oil industry, as an input for bioethanol production. This goal was worked out through studies of the process of saccharification of macaw palm coconut cake with subsequent fermentation. The biomass in question was characterized chemically, what indicated the presence of approximately 50% of carbohydrates, among which,  $23,16 \pm 0,95\%$  of starch,  $11,49 \pm 1,08\%$  of cellulose,  $9,6 \pm 0,79\%$  of hemicellulose and  $11,48 \pm 0,62\%$  of soluble sugars. For the first intervention of deconstruction of the polysaccharides present in the macauba cake it was held a  $2^{5-1}$  factorial experimental design with five factors and four central points with the following variables: concentration of sulfuric acid, time of acid pretreatment, solid / liquid ratio, amyloglucosidase and cellulose concentrations. Following, the saccharification process was optimized using central composite rotational design  $2^3$ , with three factors, four central points and six axial points, whereas the concentrations of sulfuric acid, cellulose and amyloglucosidase were evaluated. A hydrolyzed obtained in optimum condition with 92% efficiency was subjected to detoxification with activated charcoal and then, fermentability assays were carried out with yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. The yeast *S. cerevisiae* has proved resilient to the non-detoxified hydrolyzate and presented  $Y_{P/S}$  of 0.49. *P. stipitis* was found to be susceptible to the non-detoxified medium, but it was able to convert 99% of reducing sugars present in the detoxified medium. The macaw palm coconut cake showed considerable potential for bioethanol production. From the lab bench data it is possible to estimate a production of 104 l of ethanol per ton of macaw palm coconut cake.

**Keywords:** Macaw palm, Saccharification, Fermentation, Bioethanol, *Pichia stipitis*

## SUMÁRIO

	Pag.
<b>PARTE I INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1 CONTEXTUALIZAÇÃO E RELEVÂNCIA DO PROBLEMA.....	01
<b>PARTE II OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>
1 OBJETIVO GERAL.....	03
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
<b>PARTE III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>04</b>
1 BIOCOMBUSTÍVEIS E ETANOL DE 2ª GERAÇÃO.....	04
2 RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO BIODIESEL.....	08
3 SACARIFICAÇÃO.....	11
3.1 SACARIFICAÇÃO QUÍMICA.....	15
3.2 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	18
4 FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE.....	19
<b>PARTE IV MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
2 AQUISIÇÃO E TRATAMENTO PARA OBTENÇÃO DAS TORTAS E FARELOS DE BIOMASSAS. ....	21
3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS TORTAS E FARELOS.....	22
3.1 Umidade.....	22
3.2 Cinzas.....	22
3.3 Lipídeos ou Extrato etéreo.....	23
3.4 Proteínas.....	23
3.5 Fibra Bruta.....	24
3.6 Fibra Solúvel em detergente ácido (FSDA).....	24
3.7 Fibra Solúvel em detergente neutro (FSDN).....	25
3.8 Celulose.....	25
3.9 Lignina.....	26
3.10 Hemicelulose.....	26
3.11 Amido e açúcares solúveis totais.....	27
3.11.1 Preparo da amostra.....	27
3.11.2 Quantificação do teor de amido e AST.....	27
4 PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO.....	27
4.1 PROCESSO DE HIDRÓLISE QUÍMIO-ENZIMÁTICA.....	28

4.2	SELEÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE SACARIFICAÇÃO.....	30
4.3	OBTENÇÃO DO HIDROLISADO DA TORTA DE POLPA DE MACAÚBA EMPREGANDO A CONDIÇÃO SELECIONADA DE SACARIFICAÇÃO.....	30
4.4	DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO DA TORTA DE MACAÚBA.....	31
5	TESTE DE FERMENTABILIDADE.....	31
5.1	PREPARO DO INÓCULO.....	31
5.2	PREPARO E INÓCULO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	33
5.3	VARIÁVEIS DE RESPOSTA DO PROCESSO FERMENTATIVO.	33
5.3.1	Quantificação de açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART).	34
5.3.2	Quantificação do Teor de Etanol.....	34
5.3.3	Quantificação de glicose.....	35
5.3.4	Fator de rendimento de produção ( $Yp/s$ ).....	35
5.3.5	Produtividade volumétrica ( $Qp$ ).....	35
5.3.6	Eficiência fermentativa ( $Ef$ ).....	36
5.3.7	Fator de rendimento de célula em relação ao substrato ( $Yx/s$ ).....	36
5.3.8	Taxa específica de crescimento celular ( $\mu$ ).....	36
5.3.9	Tempo de Geração.....	37
5.3.10	Determinação de compostos fenólicos.....	37
<b>PARTE V</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>39</b>
1.	CARACTERÍSTICA QUÍMICA DA TORTA DA MACAÚBA.....	39
2.	PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO.....	40
3.	TESTE DE FERMENTABILIDADE.....	51
3.1	FERMENTAÇÃO COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
3.2	FERMENTAÇÃO COM <i>Pichia stipitis</i> .....	57
<b>PARTE VI</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>63</b>
1.	CONCLUSÕES.....	63
2.	SUGESTÕES OU PERSPECTIVAS.....	63
<b>PARTEVII</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Classificação dos biocombustíveis quanto à tecnologia de produção.....	04
Tabela 2: Produtividade de diferentes espécies vegetais em Kg de óleo por hectare.....	09
Tabela 3: Tecnologias aplicadas na extração da fração hemicelulósica de biomassas.....	16
Tabela 4: Planejamento experimental do tipo $2^{n-1}$ para avaliação do processo de hidrólise da torta de macaúba.....	28
Tabela 5: Condições experimentais empregadas para determinação da porcentagem de AR produzido em função do tempo de hidrólise da torta da polpa da macaúba.....	29
Tabela 6: Planejamento experimental DCCR $2^3$ para hidrólise da torta de macaúba.....	30
Tabela 7: Composição do meio sintético usado na ativação de <i>Pichia stipitis</i> .....	48
Tabela 8: Composição dos meios de fermentação e microrganismos utilizando como agentes fermentativos ( <i>P. stipitis</i> e <i>S. cerevisiae</i> ).....	33
Tabela 9 Caracterização das tortas de macaúba .....	40
Tabela 10 Fator de resposta para a hidrólise quimio-enzimática da torta de macaúba obtida por planejamento experimental do tipo $2^{n-1}$ com dois níveis, 5 fatores e 4 pontos centrais.....	41
Tabela 11 Rendimento de AR produzido em função do tempo de hidrólise enzimática da torta da polpa de macaúba.....	43
Tabela 12 Fatores de resposta do planejamento experimental DCCR $2^3$ para hidrólise quimio-enzimática da torta de macaúba.....	45
Tabela 13 Teores de amido, celulose e hemicelulose da torta de macaúba desengordurada antes e depois da sacarificação.....	51
Tabela 14 Fatores de resposta do processo fermentativo em meio de fermentação com 25% de hidrolisado e 75% de meio sintético, inoculado com levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53

Tabela 15	Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	54
Tabela 16	Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	55
Tabela 17	Dados da produtividade dos meios de fermentação constituídos de 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% hidrolisado não destoxificado (MH50) e 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	56
Tabela 18	Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído por 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25) utilizando levedura <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	58
Tabela 19	Parâmetros dos processos fermentativos em meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	60
Tabela 20	Dados gerais das variáveis de resposta dos processos fermentativos empregando meios constituídos com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando <i>Pichia stipitis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , como inóculo.....	62
Tabela 21	Parâmetros de crescimento celular dos processos fermentativos em meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	62

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fluxo de produção de bioetanol de primeira e segunda geração, segundo GOLDEMBERG (2009).....	05
Figura 2: Perfil da demanda por carros movidos a álcool.....	06
Figura 3: Produtividade média de etanol por área para diferentes culturas agrícolas.....	07
Figura 4: Metanol e etanol participando como reagentes na rota de produção do biodiesel.....	08
Figura 5: Palmeira da macaúba ( <i>Acrocomia aculeata</i> ), com frutos em cachos (a) e frutos isolados (b).....	10
Figura 6: Mapa com as áreas de ocorrência da Macaúba ( <i>Acrocomia aculeata</i> ) no Brasil.....	11
Figura 7: Constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal. (a) micrografia do material lignocelulósico em vegetal. (b) disposição do material lignocelulósico no vegetal.....	12
Figura 8: Organização e interações existentes na celulose. (a) Interações de hidrogênio intramolecular, (b) Interações de hidrogênio intermolecular.....	13
Figura 9: Estrutura química da hemicelulose, apresentando ligações glicosídicas do tipo $\beta$ -1,3 e $\beta$ -1,6.....	14
Figura 10: Esquema estrutural proposto para a lignina de <i>Picea abies</i> : (a) grupo guaiacil e (b) grupo sirigil.....	15
Figura 11: Compostos gerados durante a hidrólise ácida de polissacarídeos e lignina, que interferem no processo fermentativo.....	17
Figura 12: Modo de atuação da celulase sobre a biomassa após pré-tratamento por dispersão com água e vapor. Na primeira etapa ocorre o afrouxamento da rede cristalina da celulose em função do pré-tratamento, e em seguida o ataque das enzimas constituintes da celulase, sobre a biomassa, e por fim a ação das enzimas $\beta$ -glicosidases sobre a celobiose.....	19

Figura 13:	Vias propostas para o metabolismo de xilose e glicose em leveduras que fermentam xilose. (À esquerda, via das pentoses simplificada e à direita, via glicolítica simplificada).....	20
Figura 14:	Fermentômetros acoplados em frascos cônicos contendo meio com diferentes concentrações de hidrolisado: 25% (a), 50% (b) de hidrolisado não destoxificado e 50% (c) de hidrolisado destoxificado.....	34
Figura 15:	Fluxograma das atividades realizadas no item Materiais e Métodos.....	38
Figura 16	Curva analítica de D- glicose para a quantificação de amido e açúcares solúveis totais das amostras de torta/farelo.....	39
Figura 17	Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores avaliados sobre o processo de hidrólise enzimática da torta de macaúba. Nível de Confiança de 90%.....	42
Figura 18	Gráfico das respostas previstas pelo modelo fatorial $2^{5-1}$ e os respectivos padrões ‘desejabilidade’.....	44
Figura 19	Gráfico de Pareto para efeitos dos fatores avaliados no planejamento DCCR sobre a liberação de açúcares redutores. Nível de confiança de 90%.....	46
Figura 20	Gráfico de Pareto para efeitos dos fatores avaliados no planejamento DCCR sobre a liberação de Glicose.....	47
Figura 21	Gráfico de superfície resposta para o efeito combinado da enzima celulase ( $\mu\text{L/g}$ torta) e % de $\text{H}_2\text{SO}_4$ sobre os açúcares liberados.....	47
Figura 22	Gráficos de superfície resposta para % de AR e % de Glicose em função da concentração da enzima amiloglicosidase ( $\mu\text{L/g}$ torta) e da concentração de $\text{H}_2\text{SO}_4$ .....	48
Figura 23	Gráficos de superfície resposta para % de AR e % de Glicose em função da concentração de amiloglicosidase ( $\mu\text{L/g}$ torta) e da celulase ( $\mu\text{L/g}$ torta).....	49
Figura 24	Gráfico das respostas previstas pelo modelo fatorial DCCR e os respectivos padrões de ‘desejabilidade’ para o fator de resposta Glicose % .....	49

Figura 25	Gráfico das respostas preditas pelo modelo DCCR e os respectivos padrões de 'desejabilidade' para o fator de resposta AR %.....	50
Figura 26	Meios hidrolisados não destoxificado (a) e destoxificado(b).....	51
Figura 27	Perfil (Açúcar redutor = AR, glicose, gás carbônico = CO <sub>2</sub> e etanol) do processo fermentativo do hidrolisado da torta de macaúba elaborado com 25% de hidrolisado não destoxificado e 75% de meio sintético (MH25) conduzido com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
Figura 28	Perfil de consumo de AR Eq., glicose Eq.(g/L) e produção de CO <sub>2</sub> (g) e etanol Eq. em meio constituído por 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	54
Figura 29	Perfil de consumo de AR e glicose (g/L) e produção de CO <sub>2</sub> (g) e etanol em meio constituído por 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	55
Figura 30	Perfil de produção de CO <sub>2</sub> (g) a partir de meio de fermentação constituído de 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% hidrolisado não destoxificado (MH50) e 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como inóculo.....	56
Figura 31	Perfil de consumo de AR e glicose (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25) utilizando levedura <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	57
Figura 32	Perfil de consumo de AR e glicose (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	58
Figura 33	Perfil de consumo de AR e glicose (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura <i>Pichia stipitis</i> como inóculo.....	60
Figura 34	Crescimento celular da levedura <i>P. stipitis</i> nas três condições	

estudadas: meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxifixo (MH50)..... 61

### LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Abs	Absorbância
AMG	Amiloglicosidase
AR:	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais
atm	Atmosfera
D(+)	Isômero ótico destrógero
DCCR	Delineamento composto central rotacional
$E_f$	Eficiência fermentativa
g	Gramas
gp	Gramas de produto
gs	Gramas de substrato
gx	Gramas de biomassa
g/L	Gramas por litro
°C	Graus Celsius
h	Hora
ha	Hectar
l(-)	Isômero ótico levógero
log	Logaritmo na base 10
ln	Logaritmo neperiano
$\mu$	Taxa específica de crescimento celular

$\mu\text{L/g}$	Microlitros por grama
MH25	Meio constituído de 25% de hidrolisado não destoxificado e 75% de meio sintético
MH50	Meio constituído de 50% de hidrolisado não destoxificado e 50% de meio sintético
MH50D	Meio constituído de 50% de hidrolisado não destoxificado e 50% de meio sintético
min	Mínuto
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
$\text{NAD}^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
N	Normalidade
p	Peso
Qp	Produtividade Volumétrica
$R^2$	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minutos
S/L	Razão sólido líquido
ton	Tonelada
tg	Tempo de geração
X	Biomassa
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto em relação ao substrato
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa em relação ao substrato

## PARTE I INTRODUÇÃO

### 1 CONTEXTUALIZAÇÃO E RELEVÂNCIA DO PROBLEMA

A autossuficiência energética é tida como pré-requisito fundamental para o crescimento e bem estar de uma nação. A crise do petróleo deflagrada na década de 70 acarretou prejuízos marcantes à economia global devido ao rumo incerto de políticas das nações produtoras de petróleo localizadas no Oriente Médio. Desde então, diversas nações situadas em todos os continentes do globo deram início a programas de pesquisa e desenvolvimento com o objetivo de se tornarem autossuficientes em termos energéticos. No Brasil, o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), instituído pelo Governo Federal em 1975 (BRASIL, 1975), fomentou o uso do etanol, produzido a partir do caldo da cana-de-açúcar como combustível veicular. O desenvolvimento tecnológico gerado dentro deste programa levou o país a uma posição de destaque no cenário mundial (CANILHA, 2010).

O baixo preço do petróleo na década de 80 desestimulou fortemente o desenvolvimento de processos industriais baseados na utilização de matérias-primas renováveis para a produção de bens de consumo. Assim, embora sejam notórios os avanços conseguidos pelo Brasil na produção de etanol de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), pouco foi investido no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de biomassas lignocelulósicas (etanol de segunda geração).

Nas últimas duas décadas, a crescente preocupação mundial com as conseqüências de uma cultura tecnológica baseada no petróleo e seus efeitos sobre o meio ambiente, colocou os biocombustíveis no centro das atenções e interesses. Diversos países, dentre eles o Brasil, procuram o caminho do domínio tecnológico dos biocombustíveis, tanto no âmbito agrônômico como industrial, o que deverá provocar fortes impactos na economia brasileira e na política de inclusão social do país. Com o uso do óleo vegetal na cadeia produtiva de biocombustíveis é esperado, no Brasil, o aumento da demanda por plantas oleaginosas e conseqüentemente da oferta de fibras vegetais resultantes da extração do óleo (ABDALLA, 2008). Tal fato contribuirá para a implantação de um campo promissor de tecnologias que visem aproveitar tais resíduos para produção de bioetanol. De acordo com DEMIRBAS (2011), materiais como lixos urbanos e resíduos industriais são fontes que, com tecnologia adequada, poderiam suprir a demanda de energia. Quanto às biomassas lignocelulósicas, cabe mencionar que muitas destas estão disponíveis em abundância e, em alguns casos, são

problemas ambientais em função do seu acúmulo sem finalidade e/ou destino. Sendo assim, seu uso para produção de bioetanol sugere vantagens, pois além de evitar a concorrência pelo uso da terra com culturas alimentares, agregaria valor a tais matérias-primas, gerando divisas para o Estado, bem como, contribuiria para redução de possíveis problemas ambientais causados pelo excesso de tais resíduos.

É neste contexto que a presente dissertação foi desenvolvida. Avaliando o potencial de uma biomassa residual derivada da extração de óleo vegetal para o desenvolvimento de processo tecnológico de produção de etanol, pretende-se contribuir com os esforços feitos para viabilização de projeto global com intuito de substituir recursos fósseis por outros renováveis.

## **PARTE II OBJETIVOS**

### **1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o uso e a eficiência da torta de macaúba como insumo para produção de bioetanol.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Determinar a composição centesimal, incluindo as frações de amido, celulose e hemicelulose, da torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*).
- 2- Avaliar os efeitos dos fatores concentração do ácido sulfúrico, razão sólido/líquido, tempo e concentração de enzimas sobre o processo de hidrólise químico-enzimática da torta de macaúba através do uso de planejamento fatorial.
- 3- Otimizar processo de sacarificação enzimática da torta de macaúba através de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.
- 4- Realizar estudos de fermentabilidade do hidrolisado enzimático da torta de macaúba utilizando como agentes fermentativos as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*.

## PARTE III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 BIOCOMBUSTÍVEIS E ETANOL DE 2ª GERAÇÃO

O álcool etílico, etanol, ingressou legalmente na matriz energética nacional a partir do decreto 19.717, de 1931, que obrigava a adição de 5% de bioetanol anidro à gasolina e fora assinado por Getúlio Vargas. Inicialmente, a obrigatoriedade da mistura do etanol se restringiu à gasolina importada, sendo posteriormente exigida também na gasolina nacional. Foi com o programa Pró-álcool, na década de 1970, que o etanol combustível tomou força e foi integrado ao leque de combustíveis nacionais. Esse combustível é proveniente da fermentação do caldo gerado pela moagem da cana-de-açúcar, hoje conhecido como biocombustível de primeira geração. Essa denominação, biocombustível de primeira geração, é dada para combustíveis obtidos a partir de açúcar, óleos vegetais ou gorduras animais, que usam tecnologias convencionais (DEMIRBAS, 2011). Ainda de acordo com Demirbas (2011), etanol de segunda geração pode ser entendido como o etanol proveniente de resíduos, sejam eles agroindustriais ou urbanos, utilizando para isso uma tecnologia mais avançada. Exemplos de fonte para esse tipo de combustível são as cascas de trigo, de arroz, bagaço da cana, tortas das oleaginosas após a extração do óleo para produção do biodiesel e resíduos florestais.

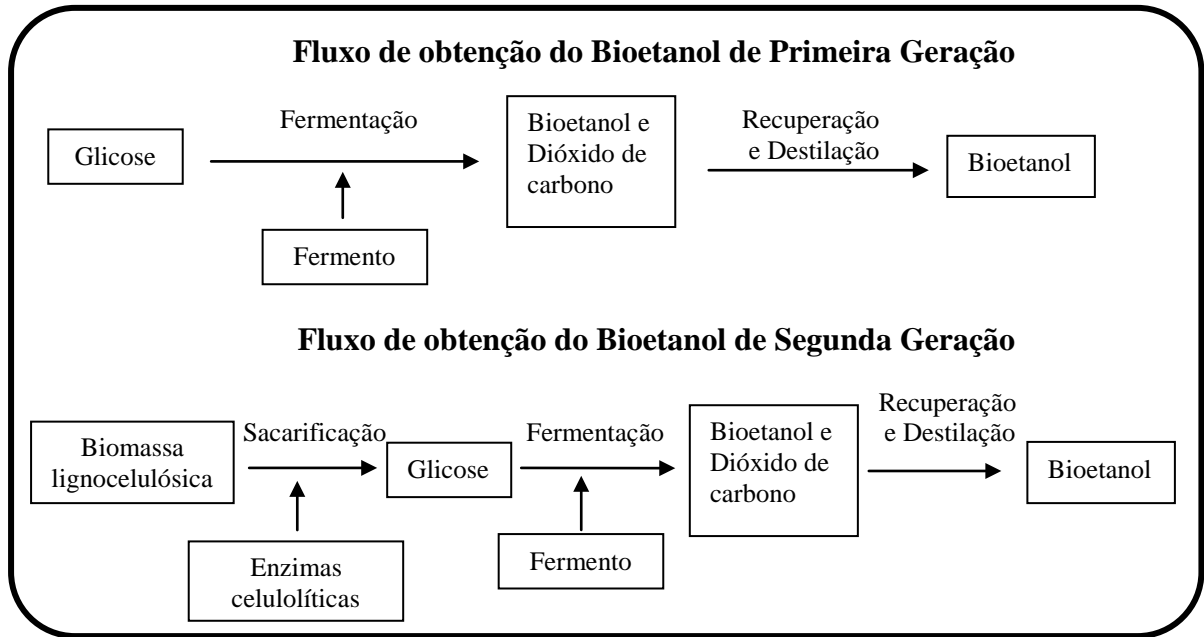
Para a obtenção de etanol a partir dessas biomassas é necessário um aparato tecnológico mais sofisticado capaz de produzir açúcares fermentescíveis, provenientes da fração lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), o que pode tornar este biocombustível mais oneroso quando comparado com o etanol de primeira geração. Dependendo da tecnologia empregada na produção de biocombustíveis, é dada uma classificação distinta, a qual pode ser vista na Tabela 1.

**Tabela 1** -Classificação dos biocombustíveis quanto à tecnologia de produção.

Geração	Matéria prima	Exemplo
1ª geração	Açúcar, amido, óleo vegetal	Bioetanol, biosyngas, biogás
2ª geração	Palha de trigo, madeira, bagaço de cana	Bioetanol, bioóleo, biohidrogênio
3ª geração	Algas	Biodiesel e óleos vegetais
4ª geração	Biodiesel	Bioquerosene, biogolina

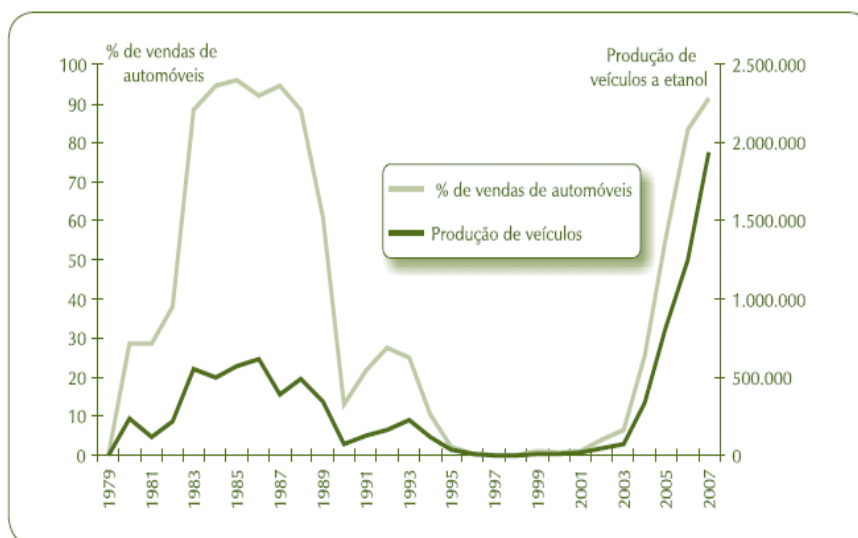
Fonte: (DEMIRBAS, 2011).

A produção do etanol de segunda geração depende do emprego tecnológico e das operações unitárias para sua obtenção. Avaliar essas duas condições é importante para fazer com que o bioetanol de segunda geração se torne viável economicamente. De maneira sucinta, na Figura 1 encontram-se ilustradas as principais diferenças do fluxo de produção entre o bioetanol de primeira e segunda geração.



**Figura 1:** Fluxo de produção de bioetanol de primeira e segunda geração, segundo Goldemberg (2009).

A demanda por bioetanol, nos mercados nacional e internacional, tende a aumentar em função da sua versatilidade e disponibilidade de matérias primas. Como exemplo tem o aumento expressivo da comercialização de carros com motor *flex-fuel*, os quais foram implantados a partir de 2003. Na Figura 2 encontra-se o perfil da demanda por carros movidos a álcool no Brasil desde a época do Pró-álcool até o ano de 2007. Na Figura 2 pode-se perceber que houve um declínio na sua venda na década de 90, havendo recuperação quando se passou a produzir carros *flex*.

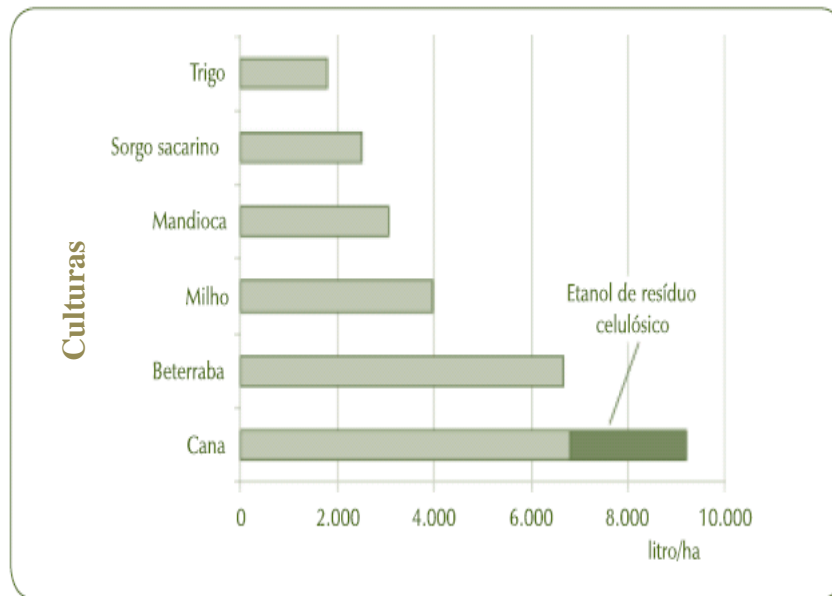


Fonte: Associação Nacional dos Fabricantes de Veículo (ANFAVEA)

**Figura 2:** Perfil da demanda por carros movidos a álcool.

Se as usinas sucroalcooleiras utilizassem não somente o caldo de cana-de-açúcar, mas também o bagaço como fonte de carboidratos, seria possível aumentar em torno de 30% (BNDES e CGEE, 2008) a produção de etanol sem aumentar a demanda por uma maior área de plantio da cana. Uma comparação entre as diferentes culturas utilizadas na produção de bioetanol é apresentada na Figura 3. Nesta figura, podem ser observados os índices de produtividade por unidade de área cultivada. Os resultados obtidos na Figura 3 correspondem às lavouras em condições de boa produtividade, que em alguns casos podem implicar elevados uso de insumo, tendo sido tomadas da literatura. As tecnologias industriais empregadas para a conversão de açúcares em bioetanol podem ser consideradas maduras e disponíveis, exceto as referentes à hidrólise de materiais lignocelulósicos, ora em desenvolvimento, adotadas para obtenção de bioetanol da parte celulósica das biomassas. Para a cana, na Figura 3, considera-se uma produção de 80 toneladas de cana por hectare, uma produtividade de 85 litros de bioetanol por tonelada de cana processada e a utilização de 30% do bagaço disponível e metade da palha, convertida em bioetanol à razão de 400 litros por tonelada de biomassa celulósica seca (BNDES e CGEE, 2008). Neste cenário, a queima da palha, atualmente deixada no campo, poderia suprir, pelo menos em parte, as necessidades energéticas das usinas de processamento (ANFAVEA, 2008).

Na Figura 3 é possível observar a produtividade média de etanol por área da cana-de-açúcar comparada com outras culturas.

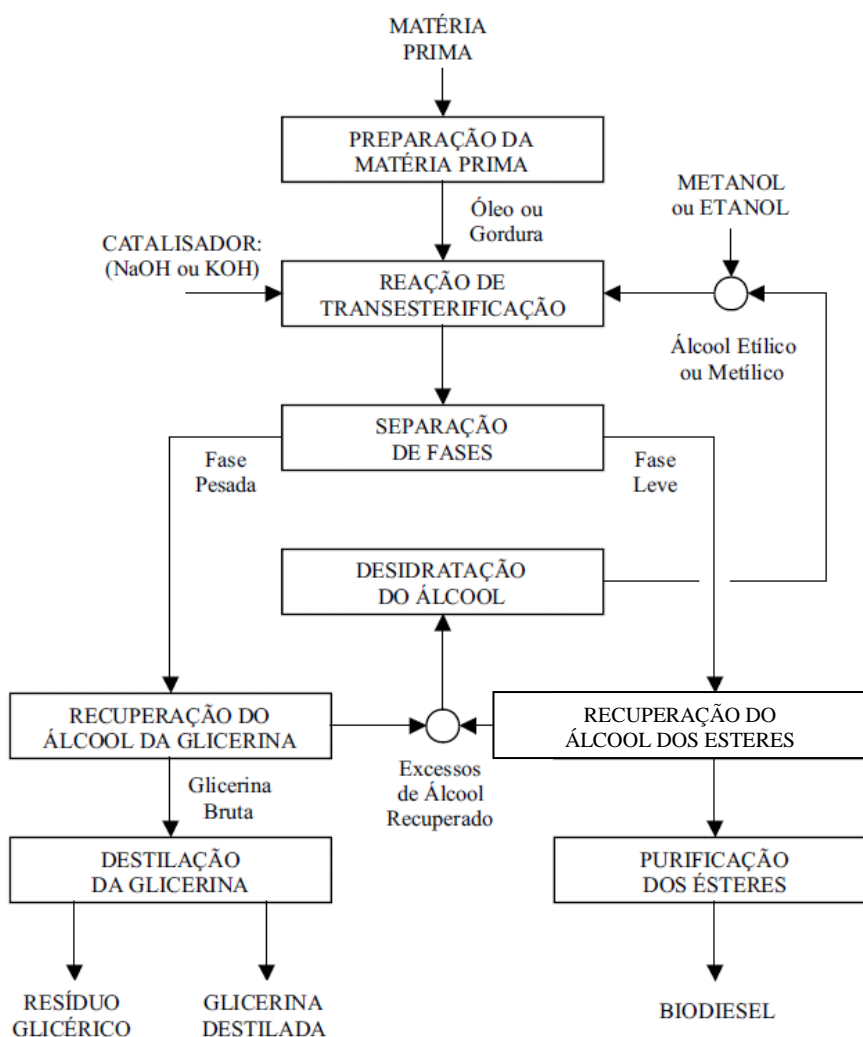


Fonte: Modificado de Global Petroleum Club (GPC, 2008).

**Figura 3:** Produtividade média de etanol por área para diferentes culturas agrícolas

A demanda por etanol não se limita apenas ao setor de veículos. O setor de biodiesel também possui interesse na produção do bioetanol, pois este combustível pode ser usado de forma integrada na produção do biodiesel, ou seja, a biomassa gerada após a extração do óleo para produção de biodiesel pode ser empregada na obtenção de bioetanol (FERRARI, 2005; KIM, 2004).

O biodiesel pode ser produzido por duas rotas químicas: metflica e etflica (Figura 4). Na rota metflica, como o nome sugere, o metanol é usado como reagente, enquanto na etflica, o reagente é o etanol. Uma das vantagens dessa integração é a utilização de um combustível renovável, uma vez que o metanol é derivado do petróleo, enquanto que o etanol é um combustível renovável.



Fonte: KIM (2004).

**Figura 4:** Metanol e etanol participando como reagente na rota de produção do biodiesel.

## 2 RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO BIODIESEL

A entrada do biodiesel na matriz energética brasileira estimulou estudos para aumentar a produtividade de culturas de oleaginosas e o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de co-produtos gerados (resíduo vegetal e a glicerina) (PARENTE, 2003). Algumas espécies de oleaginosas estão recebendo atenção especial em função da grande quantidade de óleo presente em seus grãos. Na Tabela 2 são apresentadas espécies oleaginosas que podem ser exploradas como fonte de óleo para a indústria do biodiesel.

**Tabela 2:** Produtividade de diferentes espécies vegetais em Kg de óleo por hectare.

Vegetais	Nome Científico	Kg óleo/ha	Vegetais	Nome Científico	Kg óleo/ha
Milho	<i>Zea mays</i>	145	Tungue	<i>Aleurites fordii</i>	790
Castanha de cajú	<i>Anacardium occidentale</i>	148	Girassol	<i>Helianthus annuus</i>	800
Aveia	<i>Avena sativa</i>	183	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	863
Palma	<i>Erythea salvadorensis</i>	189	Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	890
Tremoço branco	<i>Lupinus albus</i>	195	Papoula	<i>Papaver somniferum</i>	978
Seringueira	<i>Hevea brasiliensis</i>	217	Colza	<i>Brassica napus</i>	1000
kenaf L.	<i>Hibiscus cannabinus</i>	230	Oliveira	<i>Olea europaea</i>	1019
Calêndula	<i>Calendula officinalis</i>	256	Piassava	<i>Attalea funifera</i>	1112
Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>	273	Imbaúba	<i>Euphorbia lathyris</i>	1119
Maconha	<i>Cannabis sativa</i>	305	Mamona	<i>Ricinus communis</i>	1188
Soja	<i>Glycine max</i>	375	Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	1197
Café	<i>Coffea arabica</i>	386	Noz-pecã	<i>Carya illinoensis</i>	1505
Linho	<i>Linum usitatissimum</i>	402	Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i>	1528
Avelã	<i>Corylus avellana</i>	405	Babaçú	<i>Orbignya martiana</i>	1541
Euphorbia	<i>Euphorbia lagascae</i>	440	Pinhão manso	<i>Jatropha curcas</i>	1590
Moranga (abóbora)	<i>Cucurbita pepo</i>	449	Macadâmia	<i>Macadamia terniflora</i>	1887
Cânhamo	<i>Hibiscus cannabinus</i>	450	Castanha do Brasil	<i>Bertholletia excelsa</i>	2010
Mostarda	<i>Brassica alba</i>	481	Abacate	<i>Persea americana</i>	2217
Linho falso	<i>Camelina sativa</i>	490	Coco	<i>Cocos nucifera</i>	2260
Gergelim	<i>Sesamum indicum</i>	585	Oiticica	<i>Licania rigida</i>	2520
Crambe	<i>Crambe abyssinica</i>	589	Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	2743
Cártamo	<i>Carthamus tinctorius</i>	655	Pequi	<i>Caryocar brasiliense</i>	3142
buffalo gourd	<i>Cucurbita foetidissima</i>	665	<b>Macaúba</b>	<b><i>Acrocomia aculeata</i></b>	<b>3775</b>
Arroz	<i>Oriza sativa L.</i>	696	Óleo de palma	<i>Elaeis guineensis</i>	5000

Adaptado de Tickell *et al.* (2000).

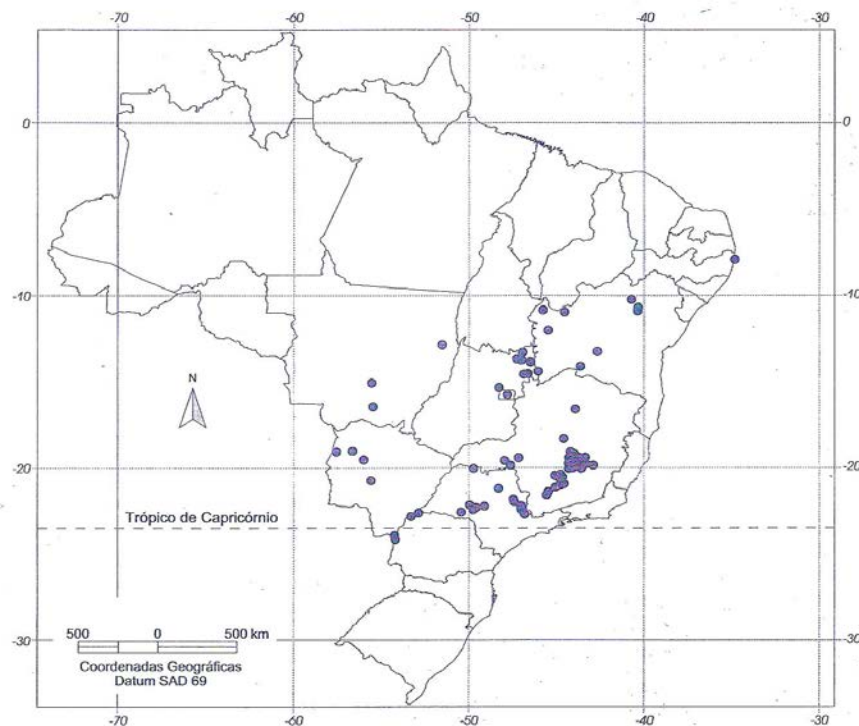
Entre as espécies apresentadas na Tabela 2, a macaúba destaca-se como uma das biomassas mais produtivas em óleo. Essa característica tem estimulado estudos para o melhoramento desta palmácea, com vista a torná-la apta para o cultivo comercial destinado a alimentar a indústria do biodiesel.

A macaúba (Figura 5) é uma palmeira pertencente à família das *Arecaceae*, seus frutos são drupas globosas que variam de coloração verde oliva a amarela (CARVALHO, 2008). Sua produtividade em óleo utilizado na confecção de cosméticos tem despertado interesse na indústria de biodiesel (MOTOIKE et al., 2011). O teor de óleo da polpa é 16,5% no fruto fresco (HIANE, 2005) e possui uma produção de frutos de até 30 ton/ha (CARVALHO, 2008). Na Figura 6 encontra-se a distribuição geográfica de ocorrência da macaúba no Brasil.



Fonte: [http://www.plantapalm.com/vpe/photos/Species/acrocomia\\_aculeata.htm](http://www.plantapalm.com/vpe/photos/Species/acrocomia_aculeata.htm).

**Figura 5.** Palmeira da macaúba (*Acrocomia aculeata*), com frutos em cachos (a) e frutos isolados (b)

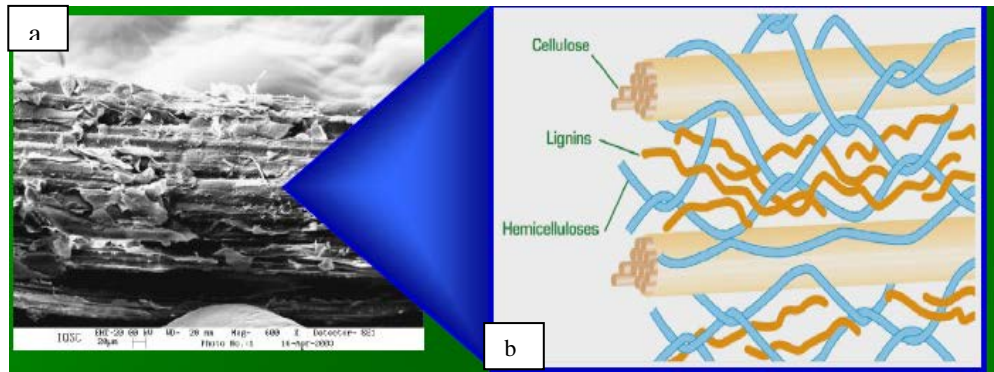


Fonte: Carvalho (2008).

**Figura 6:** Mapa com as áreas de ocorrência da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) no Brasil.

### 3 SACARIFICAÇÃO

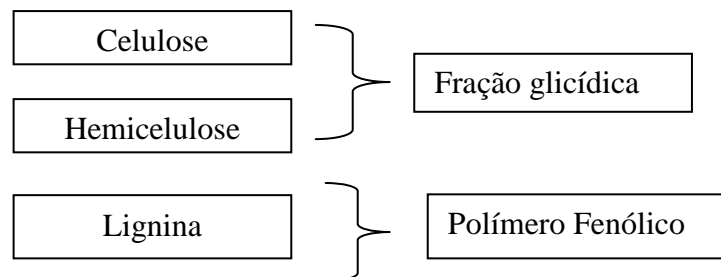
A sacarificação consiste em hidrolisar polissacarídeos a fim de se obter açúcares com número reduzido de resíduos, variando de C1 a C5, por exemplo. Esse processo pode ser de natureza físico/química ou enzimática. De acordo com Arantes, (2010) o processo de sacarificação enzimática consiste em um sistema de reação heterogêneo em meio aquoso que solubiliza estruturas macroscópicas. A hidrólise química consiste em um pré-tratamento empregando soluções de ácidos, geralmente diluídas, que aumentam a superfície de contato para uma ação enzimática (OLOFSSON et al., 2008). Nos resíduos agroindustriais, as hidrólises de interesse para produção de bioetanol acontecem nas frações amilácea, celulósica, e hemicelulósicas. Na Figura 7 encontra-se ilustrado a disposição de constituintes lignocelulósicos em resíduo vegetal agroindustrial.



Fonte: BOUDET et al. (2003) e TRINDADE et al. (2004).

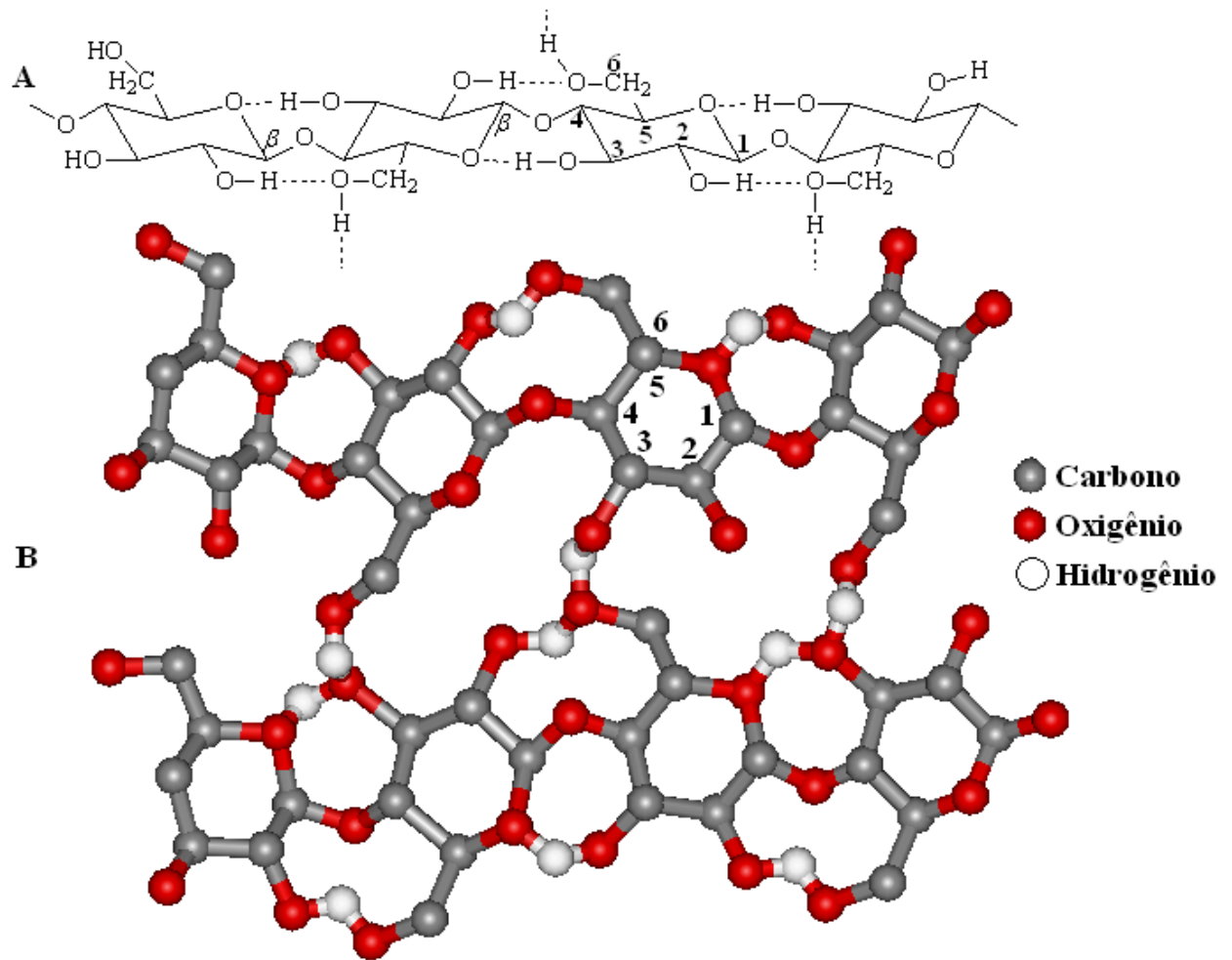
**Figura 7:** Constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal. (a) micrografia do material lignocelulósico em vegetal. (b) disposição do material lignocelulósico no vegetal.

Para que essas frações sejam utilizadas na produção de bioetanol torna-se necessário um processo de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da celulose e hemicelulose nas biomassas, gerando assim, carboidratos menos complexos, como oligômeros (INOUE et al., 2008). A rede lignocelulósica pode ser dividida em três partes:



As características de cada fração lignocelulósica são apresentadas a seguir:

- a) Celulose – homopolissacarídeo formado por glicose através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 (Figura 8).

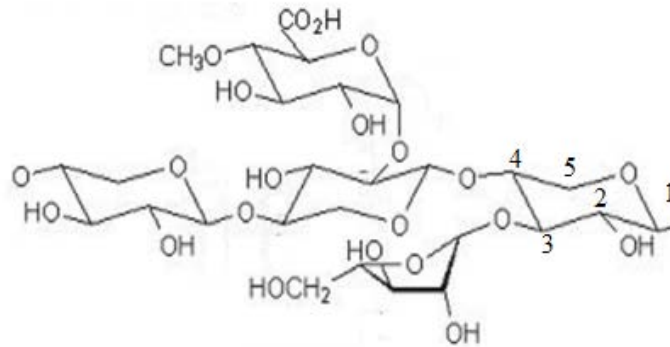


Fonte: LEHNINGER modificado (2005).

**Figura 8:** Organização e interações existentes na celulose. (a) Interações de hidrogênio intramolecular, (b) Interações de hidrogênio intermolecular.

Segundo RIBEIRO (2004) a celulose é o carboidrato mais abundante da natureza e o polissacarídeo responsável por conferir resistência aos vegetais, fazendo parte da sua parede celular. Sua constituição se baseia em cadeias lineares de glicose, que variam de 100 a 200 unidades. Este autor reporta ainda, que a celulose é estabilizada por interações de hidrogênio intra e inter molecular, sendo esta interação realizada pela hidroxila ligada ao carbono três e o oxigênio do anel piranosídico do monossacarídeo adjacente. Essas interações são responsáveis pela estrutura cristalina existente na celulose, assim como sua insolubilidade em água, uma vez que tais hidroxilas estão comprometidas com as interações intra e intermoleculares.

b) Hemicelulose - constituídas por cadeias de açúcares curtas, lineares e altamente ramificadas (D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-manose, l-arabinose), sendo xilose e arabinose os mais abundantes (Figura 9).



Fonte: [http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revisata/rev3204.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revisata/rev3204.pdf).

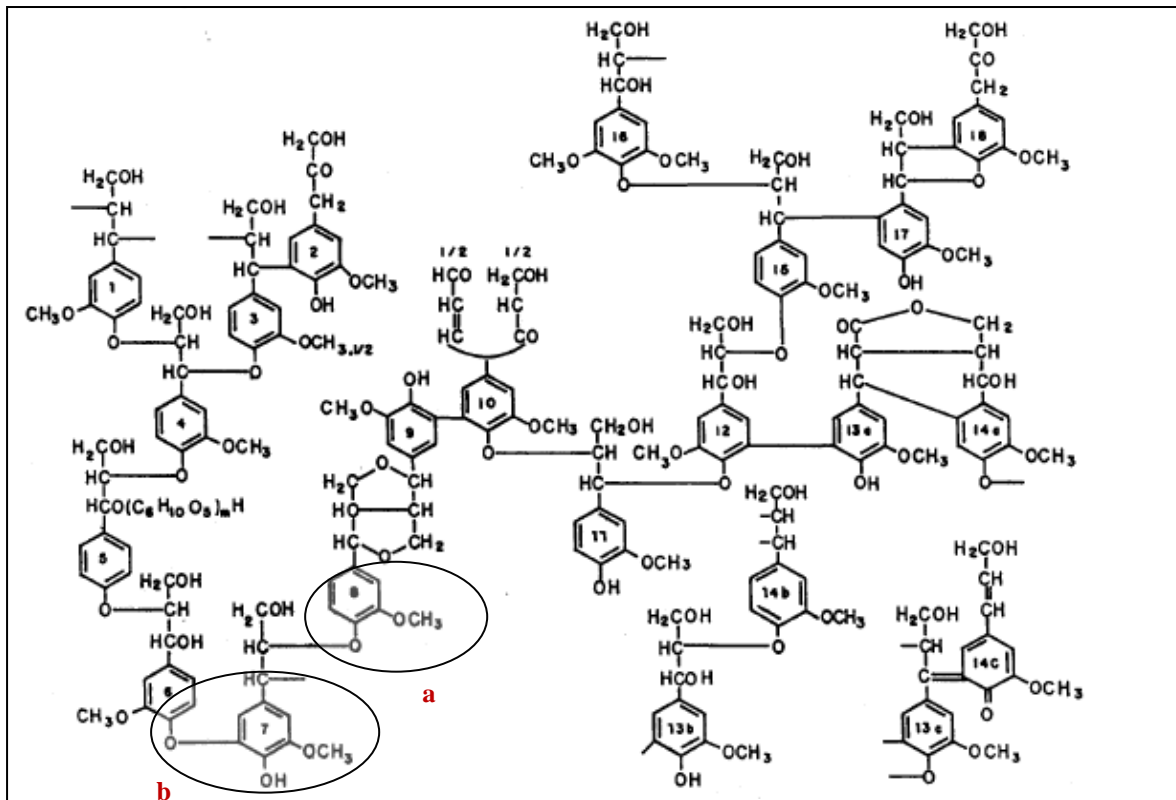
**Figura 9:** Estrutura química da hemicelulose, apresentando ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3.

A hemicelulose é um polímero de natureza mais heterogênea que a celulose, sendo necessárias várias enzimas para degradá-la (JUHÁ, 2004). As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos de polissacarídeos de baixa massa molecular, associados à parede celular das plantas com a celulose e a lignina. São heteroglicanos constituídos por relativamente poucos resíduos de açúcar, sendo os mais comuns a D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e l-arabinose, que conferem características aos diferentes tipos de hemicelulose como arabinogalactana, galactoglicomanana, glicomanana e arabinoxilana (RIBEIRO, 2004; CANILHA, 2008). O principal componente da fração hemicelulósica dos resíduos agroindustriais é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose que pode ser hidrolisada usando-se ácidos minerais. A xilana possui uma estrutura linear constituída de resíduos de xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$  (1-4) que são encontradas em todas as plantas terrestres e compreendem 30% do material da parede celular (SILVA, 1998).

c) Lignina - macromolécula constituída de unidades de fenol e seus derivados apresentando uma conformação tridimensional e amorfa.

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Foi introduzida por Schultz, em 1857, para designar o material que hoje se sabe ser o segundo mais abundante do reino vegetal, logo depois da celulose. As ligninas só não estão presentes em vegetais primitivos não lignificados (VELOSO, 2003).

Na Figura 10 encontra-se a representação de uma estrutura da fração de lignina, onde pode se observar sua complexidade estrutural formada por subunidades derivadas do fenol, merecendo destaque para o resíduo guaiacil (a) e sirigil (b). De acordo com Veloso(2003), existe ainda uma subunidade, o hidroxifenilpropanóide (não representado nesta figura), que também é constituinte de polímero fenólico.



Fonte: VELOSO (2003).

**Figura 10:** Esquema estrutural proposto para a lignina de *Picea abies*: (a) grupo guaiacil e (b) grupo sirigil.

### 3.1 SACARIFICAÇÃO QUÍMICA

O sucesso para a utilização dos polissacarídeos na obtenção do bioetanol é uma soma de técnicas e está diretamente relacionado com o objetivo e o tipo de processo a ser usado. Na Tabela 3 estão citadas algumas técnicas de hidrólise de biomassas utilizadas para obter a fração hemicelulósica, separando-a da lignina e celulose.

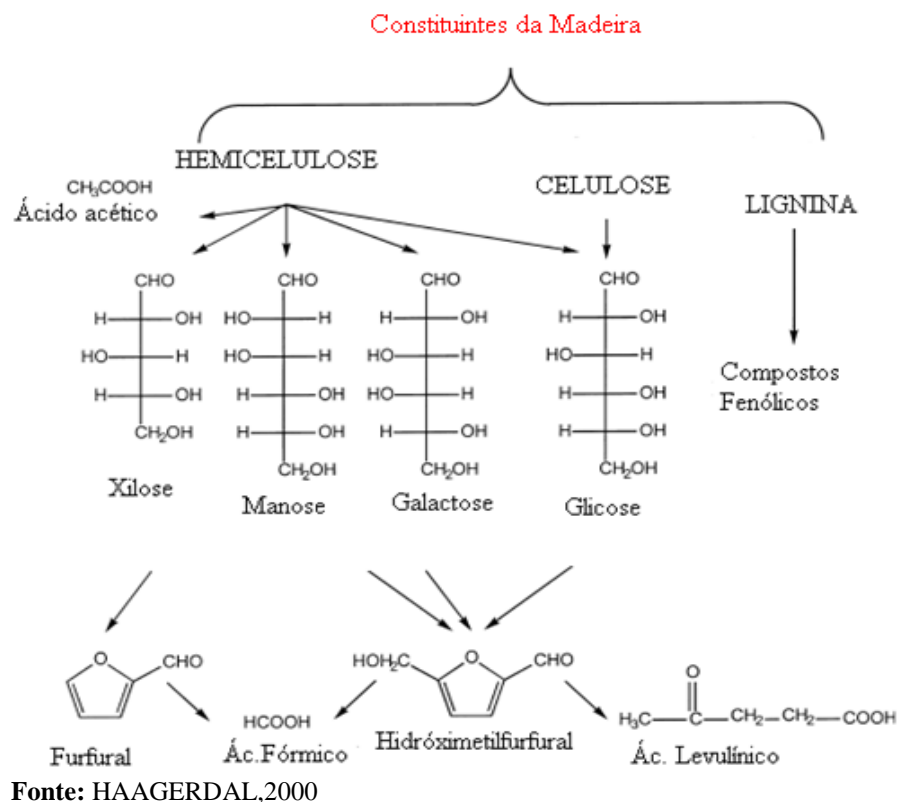
**Tabela 3:** Tecnologias aplicadas na extração da fração hemicelulósica de biomassas.

Processos	Descrição	Tempo de reação	Rendimento de xilose	Custo
<b>Físicos</b>				
Explosão de vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160° - 260°), seguido de uma rápida descompressão	1 – 10 min	45% - 65%	-
Termoidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose	30 min	88% - 98%	-
<b>Químicos</b>				
Hidrólise ácida	Por meio de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentrados ou diluídos	2 – 10 min	75% - 90%	+
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio ou cálcio	2 min	60% - 75%	++
Organossolventes	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, etanol, acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose	40 – 60 min	70% - 80%	
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos			
<b>Combinados</b>				
Explosão de vapor catalisada	Adição de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ou SO <sub>2</sub> ) ou CO <sub>2</sub> na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose	1 – 4 min	88%	-
Afex (ammonia líber explosion)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão		50 – 90%	
Explosão de CO <sub>2</sub>	Similar à pressão de vapor		75%	

Fonte: BNDES & CGEE (2008).

Soluções ácidas, concentradas ou diluídas, aliadas às altas temperaturas e pressões (hidrólise termoquímica ou pré-tratamento) podem promover a hidrólise do amido e celulose, obtendo mono, di e trissacarídeos e dextrinas, e dependendo do objetivo, se torna uma técnica útil por ser rápida e simples. Segundo Macedo et al., (2011) esse tipo de técnica gera açúcares fermentescíveis provenientes principalmente da fração amilácea e hemicelulósica do vegetal, e quebra a rede lignocelulósica expondo o material ao ataque enzimático.

Os principais componentes da celulose e hemicelulose são glicose e xilose, respectivamente (TANIGUCHI, 1997). Os monômeros disponibilizados durante o processo de hidrólise química, que servem de substrato em bioprocessos são consumidos de acordo com a característica do microrganismo empregado como agente fermentativo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar apenas hexoses como a glicose, enquanto que *Pichia stipitis*, outra espécie de levedura, fermenta, além da glicose, xilose (AGBOGBO, 2006). A desvantagem da sacarificação química são os produtos secundários gerados durante o processo, pois o ácido promove a desidratação dos açúcares gerando furfural a partir das pentoses e hidroximetilfurfural, a partir das hexoses, que se tornam inibidores do processo fermentativo (HAAGERDAL, 2000). Na Figura 11 estão apresentados alguns compostos provenientes da hidrólise que interferem no processo fermentativo.



**Figura 11:** Compostos gerados durante a hidrólise ácida de polissacarídeos e lignina, que interferem no processo fermentativo.

### 3.2 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A sacarificação enzimática é um processo hidrolítico com alta especificidade quanto aos substratos. Como principais vantagens em relação ao processo hidrolítico com ácidos inorgânicos, estão à formação de monossacarídeos como principal produto, e a não formação de subprodutos indesejáveis, como os furfurais.

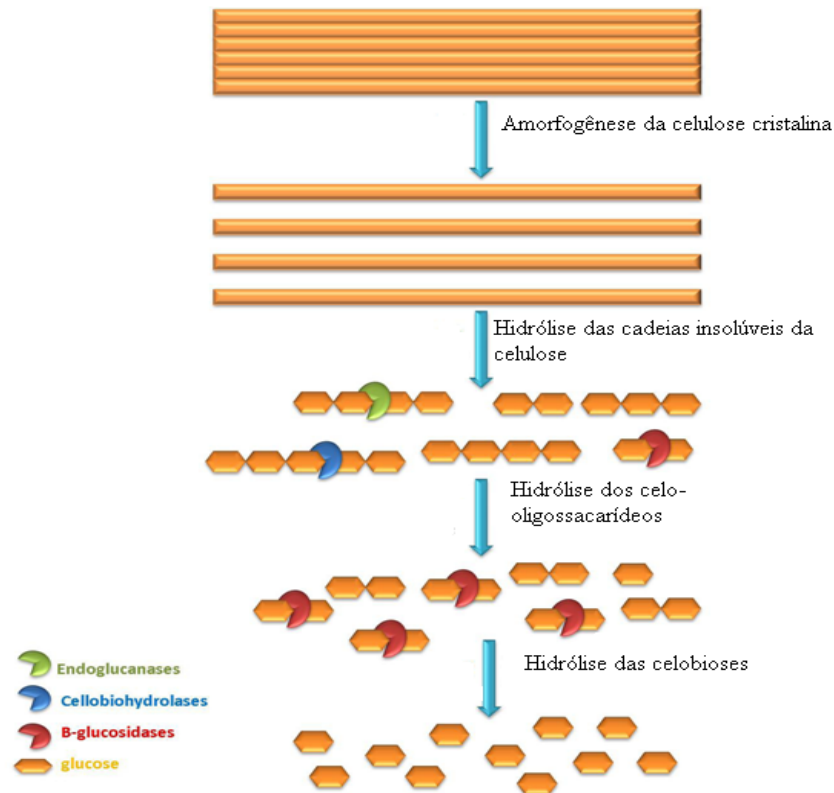
Na conversão de polissacarídeos em açúcares prontamente fermentáveis por leveduras, podem ser usadas enzimas específicas de acordo com a natureza do polissacarídeo presente na biomassa. Para biomassas amiláceas usam-se enzimas amilolíticas, geralmente produzidas por microrganismos. Para biomassas lignocelulósicas usam-se enzimas lignocelulolíticas, também produzidas por microrganismos. Em relação às amilases, elas podem ser classificadas segundo Bernfeld (1951) como:

- a)  $\alpha$ -amilase (alfa-amilase) – Reduz a viscosidade do amido hidrolisando de forma randômica o polímero, produzindo oligômeros de glicose.
- b)  $\beta$ -amilase (Beta-amilase) – Hidrolisa as ligações glicosídicas gerando maltose.
- c) Amiloglicosidase (AMG) – Hidrolisa sucessivas ligações glicosídicas ( $\alpha$  1,4 e  $\alpha$  1,6) terminais não redutoras, produzindo dessa forma glicose.

A celulase é um complexo enzimático que consiste de três tipos de enzimas, a endoglicanase, exoglicanase e  $\beta$ -glicosidase (JUHÁ, 2004). As formas gerais de atuação de cada uma delas estão descritas a seguir:

- a) Endoglicanase – hidrolisam randomicamente a cadeia de celulose liberando celoligossacarídeo;
- b) Exoglicanases: (celodextrinases e celobiohidrolase) hidrolisam terminais redutores e não redutores; liberando celobiose
- c) Celobiase ( $\beta$ -glicosidase) – hidrolisa a celobiose, gerando glicose.

De acordo com Juhá (2004), esse complexo enzimático atua de forma sinérgica no processo da hidrólise. Na Figura 12, está representado o modo de ação das enzimas do complexo celulase em material previamente pré-tratado.



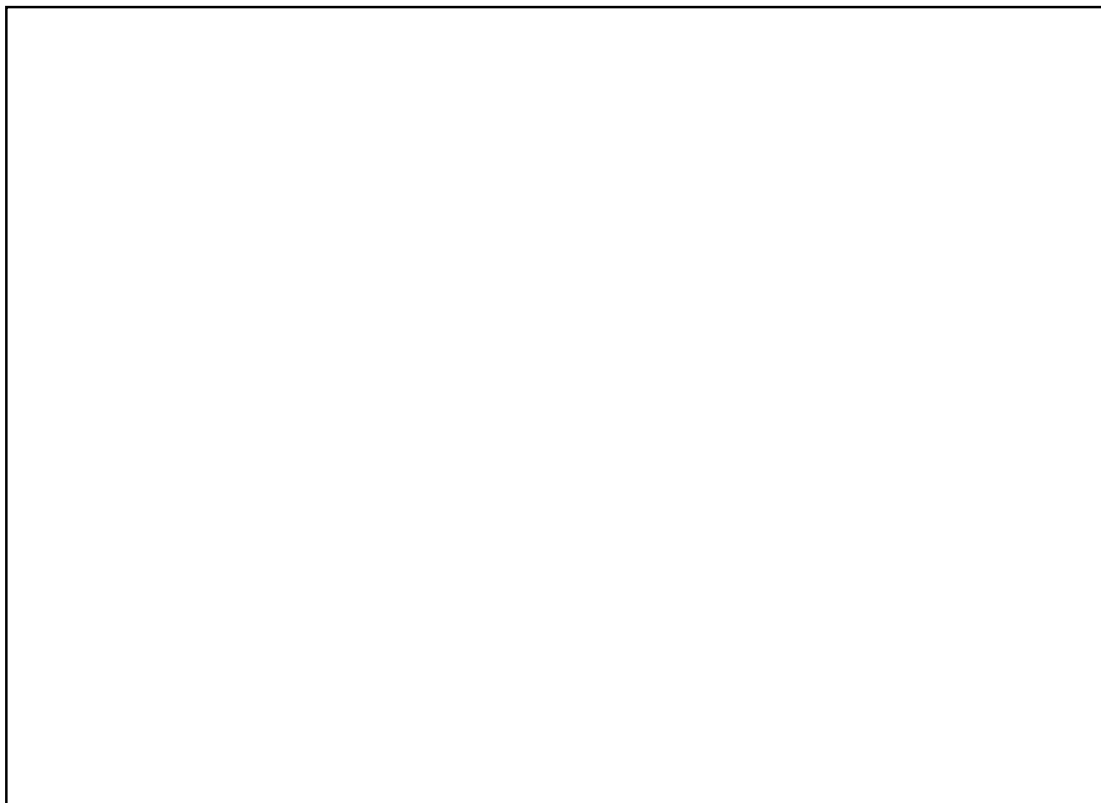
Fonte: (ARANTES & SADLER, 2010).

**Figura 12:** Modo de atuação da celulase sobre a biomassa após pré-tratamento por dispersão com água e vapor. Na primeira etapa ocorre o afrouxamento da rede cristalina da celulose em função do pré-tratamento, e em seguida o ataque das enzimas constituintes da celulase, sobre a biomassa, e por fim a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase sobre a celobiose.

#### 4 FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE

A fermentação é um conjunto de reações enzimáticas, que ocorrem no interior da célula microbiana, com o intuito de gerar energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas. As hexoses são facilmente fermentadas pela levedura *S. cerevisiae*, cujo processo é bem conhecido. Já as pentoses, por sua vez, incapazes de serem fermentadas por esta levedura (RUNQUIST, 2010), são fontes de diferentes estudos envolvendo processos biotecnológicos de utilização destes açúcares para a produção de etanol. A levedura *S. cerevisiae*, uma das leveduras mais eficazes na produção de etanol a partir de hexoses, possui alta tolerância ao produto (etanol) e a outros compostos inibitórios, como àqueles presentes em hidrolisados ácidos de biomassa lignocelulósica (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996; HAHN-HAGERDAL et al., 2001). A transformação das pentoses segue uma via metabólica

diferente das hexoses, chamada de via das pentoses-fosfato, como apresentado de maneira simplificada na Figura 13.



Fonte: HAHN-HAGERDAL, 1994.

**Figura13:** Vias propostas para o metabolismo de xilose e glicose em leveduras que fermentam xilose. (À esquerda, via das pentoses simplificada e, à direita, via glicolítica simplificada).

A via metabólica utilizada pelas leveduras para a bioconversão de xilose em etanol se inicia com o transporte da xilose para o interior da célula através da membrana celular. Em seguida essa pentose é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase XR, na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela coenzima NAD<sup>+</sup> ligada à xilitol desidrogenase – XDH. A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato a intermediários da via glicolítica (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato). Esses intermediários podem então ser metabolizados por esta via, a qual está conectada a outras como o ciclo de Krebs e as reações de fermentação alcoólica

## PARTE IV MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi organizado em 4 etapas como apresentado a seguir:

Etapa 1 – *Aquisição e tratamento da matéria prima* – Essa etapa consistiu em adquirir e preparar amostras de tortas de macaúba.

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

Etapa 3 - *Processo de sacarificação* – Nesta etapa a torta de macaúba foi submetida a processos hidrolíticos aplicando planejamento experimental a fim de otimizar a sacarificação.

Etapa 4 - *Teste de fermentabilidade* – Essa etapa consistiu em avaliar a fermentabilidade do hidrolisado obtido em condição previamente otimizada utilizando como agente fermentativo as leveduras *S. cerevisiae* e *P. stipitis*. Foram avaliados ainda, os efeitos do tratamento de destoxificação do hidrolisado sobre o rendimento fermentativo.

### 2 AQUISIÇÃO E TRATAMENTO PARA OBTENÇÃO DAS TORTAS E FARELOS DE BIOMASSAS

A torta da polpa de macaúba foi obtida por doação pelo ICA – Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, situado na cidade de Montes Claros - MG, que processou o fruto proveniente da UBCM – Unidade de Beneficiamento do coco de Macaúba, distrito de Montes Claros - MG. A torta de macaúba foi processada segundo FARIAS (2010), sendo que o fruto foi despolpado manualmente e a polpa seca em estufa com circulação de ar a 105°C até massa constante, por aproximadamente 3 horas. A extração do óleo foi realizada por prensagem em prensa tipo *Expeller* da marca “Oekotec” modelo CA59G de escala laboratorial (mínimo 200g) com capacidade de extração de 7kg/h. A extração foi realizada na menor velocidade do equipamento.

A torta de macaúba foi triturada em moedor manual, passada em peneira com malha de 0,2mm, e em seguida submetida a análises químicas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação da Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

### 3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA TORTA E FARELO

A torta de macaúba, previamente triturada, foi submetida às análises químicas descritas a seguir:

#### 3.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolph Lutz (IAL, 2008). Foram pesados 3,0g de amostra (triplicata) em placas de vidro, previamente desumificadas em estufa a 105°C. As amostras foram mantidas em estufa a 105°C, até peso constante. O resultado foi calculado segundo a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de umidade.

$$U = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{P_{mi}} \times 100$$

U = teor de umidade, em porcentagem

P<sub>mi</sub> = massa (g) do vidro de relógio com amostra inicial,

P<sub>mf</sub> = massa (g) do vidro de relógio com amostra seca

#### 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).

$$C = \frac{(M - P)}{A} \times 100$$

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

### 3.3 Lipídeos ou Extrato etéreo

Cerca de 1,0g de amostra (triplicata) foram transferidos para cartuchos de papel de filtro qualitativo, com porosidade de 12,5µm. Em seguida foram colocados em aparelho extrator Soxhlet. Os lipídeos foram extraídos com éter etílico por aproximadamente 8 horas e coletados em balões de fundo chato de 250mL, previamente aquecidos a 105°C e resfriados até temperatura ambiente em dessecador e pesados. Após a extração, os balões foram colocados 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. O resultado foi determinado segundo a fórmula abaixo (IAL, 2008).

$$LIP = \frac{(M - P)}{A} \times 100$$

LIP = teor de lipídeo, em porcentagem

M = massa (g) do balão com amostra após secar na estufa

P = massa (g) do balão vazio

A = massa (g) da amostra inicial

### 3.4 Proteínas

O teor de proteína foi quantificado pelo método Kjeldal adicionando-se cerca de 0,5g de amostra (em triplicata), 600mg de sulfato de potássio, 10mL de ácido sulfúrico concentrado e 300mg de sulfato de cobre em um tubo de vidro, seguido de digestão, a 350°C, até o material contido no tubo ficar límpido. 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 (IAL, 2008).

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

Prot (%) = teor de proteínas, em porcentagem

V(HCl) = Volume gasto de 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

### 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 cerca de 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 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 biomassa integral. A fórmula utilizada para o cálculo do teor de fibra bruta segue abaixo:

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

FB = teor de fibra bruta, em porcentagem

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

F = massa do filtro 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). (BNDES e CGEE, 2008)*

### 3.6 Fibra Solúvel em detergente ácido (FSDA)

Cerca de 0,25g 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 sintetizados, previamente desumificados em estufas a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Os filtros foram secos em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em % de FSDA/g de torta íntegra, calculada usando a seguinte fórmula:

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

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)

### 3.7 Fibra Solúvel em detergente neutro (FSDN)

Cerca de 0,25g de amostra foram transferidos para tubo de ensaio, juntamente com 25mL de solução de detergente neutro. As amostras contidas nos tubos foram digeridas em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Em seguida o material foi filtrado em filtros sintetizados, previamente desumidificados em estufa a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Em seguida, os filtros foram secos em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em % de FSDN/g de torta íntegra, usando seguinte fórmula:

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

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

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

Fvazio= massa do filtro vazio(g)

### 3.8 Celulose

Após a pesagem dos filtros sintetizados na análise de FSDA, foi adicionado nos filtros 30mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) com agitação vigorosa. Após o escoamento completo do ácido, os filtros foram lavados com água destilada quente (90-100°C), por três vezes. Em seguida foram secos em estufa 105°C, até peso constante, sendo resfriados em dessecador e pesados. A massa de celulose foi dada pela diferença da massa do filtro sintetizado 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.

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

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

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

CEL(%) = teor de celulose

### 3.9 Lignina

Para o cálculo do teor de lignina, foram incineradas em mufla à 550°C as amostras remanescente da análise de celulose. Após a completa incineração, os filtros foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente. O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do filtro sintetizado antes da incineração e a massa do filtro sintetizado após incineração resfriado em dessecador. Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de massa integral

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

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

Fmufla = massa do filtro com resíduo depois da mufla (g)

LIG(%) = teor de lignina

### 3.10 Hemicelulose

Para o cálculo do teor de hemicelulose, foi necessário fazer a 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.

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

HEM = teor de hemicelulose, em porcentagem

$m(\text{FSDA})$  = massa da amostra remanescente da análise de FSDA (g)

$m(\text{FSDN})$  = massa da amostra remanescente da análise de FSDN (g)

### **3.11 Amido e açúcares solúveis totais**

Os teores de amido e açúcares solúveis totais foram determinados segundo a metodologia descrita por McCready, 1950, sendo as amostras previamente preparadas

#### **3.11.1 Preparo da amostra**

Em tubo de centrifuga (triplicata), foram adicionados 0,2g de amostra e 10mL álcool 80% fervente. Em seguida o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 3000rpm. Esse processo foi repetido por três vezes. A fração do sobrenadante foi coletada e avolumada para 50 mL em balão volumétrico, para posterior quantificação de açúcares solúveis totais (AST). A partir do precipitado foi realizada a extração do amido. Ao resíduo da extração foram adicionados 11,5mL de ácido perclórico 30% e agitado em agitador tipo vortex por dois minutos. Em seguida, o tubo foi deixado em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional e então, centrifugado a 3000rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por três vezes. O sobrenadante foi coletado e avolumado em balão volumétrico de 10mL para posterior quantificação do amido.

#### **3.11.2 Quantificação do teor de amido e AST**

As quantificações dos teores de amido e AST foram realizadas com solução de antrona 0,1% em ácido sulfúrico. Foi feita uma curva analítica (ver apêndice) utilizando D-glicose nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1g/L. Foi coletado 1mL de cada amostra, previamente diluída, e adicionado 5mL da solução de antrona, em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados em banho de água fervente por doze minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 620nm.

## **4 PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO**

Esta etapa consistiu em definir as melhores condições de sacarificação da fração glicídica da biomassa selecionada. Este procedimento foi realizado avaliando-se as condições de pré-tratamento e de hidrólise enzimática.

#### 4.1 PROCESSO DE HIDRÓLISE QUÍMIO-ENZIMÁTICA

Para a realização do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática, foram feitos dois desenhos experimentais. O primeiro desenho foi do tipo  $2^{n-1}$ , com 4 pontos centrais, onde “n” é o número de fatores a serem estudados. Os 4 pontos centrais foram os pontos 17C, 18C, 19C, e 20C. Neste desenho foram avaliados 5 fatores, sendo estes: razão sólido/líquido (S/L), concentração de ácido sulfúrico, tempo de pré-tratamento, concentração da enzima amiloglicosidase (Spirizyme®) e concentração da enzima celulase (Celluclast®). Para cada fator foram escolhidos dois níveis, como descrito na Tabela 4.

**Tabela 4:** Planejamento experimental do tipo  $2^{n-1}$  para avaliação do processo de hidrólise da torta de macaúba

Amostra	Pré-tratamento			Hidrólise enzimática			
	S/L %	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %	Tempo (min)	Amiloglicosidase		Celulase	
				μL/g torta	AGU/g torta	μL/g torta	EGU/g torta
1	20	2	20	10	8,6	100	85
2	50	2	20	10	8,6	10	8,5
3	20	8	20	10	8,6	10	8,5
4	50	8	20	10	8,6	100	85
5	20	2	60	10	8,6	10	8,5
6	50	2	60	10	8,6	100	85
7	20	8	60	10	8,6	100	85
8	50	8	60	10	8,6	10	8,5
9	20	2	20	100	86	10	8,5
10	50	2	20	100	86	100	85
11	20	8	20	100	86	100	85
12	50	8	20	100	86	10	8,5
13	20	2	60	100	86	100	85
14	50	2	60	100	86	10	8,5
15	20	8	60	100	86	10	8,5
16	50	8	60	100	86	100	85
17	35	5	40	55	47,3	55	46,8
18	35	5	40	55	47,3	55	46,8
19	35	5	40	55	47,3	55	46,8
20	35	5	40	55	47,3	55	46,8

O planejamento experimental foi realizado com 2 níveis, 5 fatores e 4 pontos centrais (17C, 18C, 19C, 20C), com 20, 40 e 60 minutos de pré-tratamento ácido e, 24 horas de temperatura da hidrólise enzimática a 50°C

AGU (Unidade de amiloglicosidase) = quantidade de enzima necessária para catalisar a conversão de 1mmol de maltose por minuto por mL de enzima

EGU (Unidade de endoglicanase) = quantidade de enzima necessária para catalisar a conversão de 1mmol de celobiose por minuto por mL de enzima.

Com base no desenho experimental foram estudadas 20 condições diferentes, as quais foram realizadas em frascos cônicos de 125mL e submetidas a 120°C. As amostras tiveram o pH corrigidos com hidróxido de cálcio e a razão S/L foi diminuída para 15%, antes de se dar início ao processo enzimático. O tempo de hidrólise enzimática foi de 24 horas a 50°C, como descrito na Tabela 4.

Os fatores e níveis avaliados foram: razão S/L (20 e 50%); concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 e 8%); tempo de pré-tratamento (20 e 60 minutos); concentração de amiloglicosidase (Spirizyme®) (8,6 a 86 AGU); concentração de celulase (Celluclast®) (8,5 a 85 EGU). Os fatores de respostas para esse planejamento foram açúcar redutor (AR) e glicose.

Na Tabela 5 está apresentado um estudo com períodos maiores que 24 horas de incubação da enzima visando obter um aumento significativo na porcentagem dos açúcares redutores hidrolisados.

**Tabela 5:** Condições experimentais empregadas para determinação da porcentagem de AR produzido em função do tempo de hidrólise da torta da polpa da macaúba.

Amostra	Pré tratamento			Hidrólise Enzimática			
	Tempo de hidrólise Enzimática (h)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	S/L (%)	Amiloglicosidase		Celulase	
				μL/g torta	AGU/g torta	μL/g torta	EGU/g torta
1	24	3,5	15	30	25,8	25	21,2
2	48	3,5	15	30	25,8	25	21,2
3	72	3,5	15	30	25,8	25	21,2
4	96	3,5	15	30	25,8	25	21,2
5	120	3,5	15	30	25,8	25	21,2

A partir dos resultados obtidos no planejamento 2<sup>n-1</sup>, foi realizado um segundo planejamento, sendo do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>, com 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C) e 6 pontos axiais (9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x) como descrito na Tabela 6. Nesse planejamento foram estudados 3 fatores com dois níveis, sendo estes: concentração de ácido sulfúrico (2 e 5%); concentração de amiloglicosidase (Spirizyme®) (8,6 a 29,4 AGU), concentração de celulase (Celluclast®) (4,2 a 24,7 EGU). A

razão S/L de 20%, a temperatura de 120°C, 30 minutos e o tempo da hidrólise química (24 horas) foram fatores constantes nesse segundo experimento.

**Tabela 6.** Planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup> para hidrólise quimio-enzimática da torta de macaúba

Amostras	Hidrólise química		Hidrólise enzimática		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Celulase μL/g torta	EGU/g torta	Amiloglicosidase μL/g torta	AGU/g torta
1	2	5	4,2	10	8,6
2	2	25	21,2	10	8,6
3	2	5	4,2	30	25,8
4	2	25	21,2	30	25,8
5	5	5	4,2	10	8,6
6	5	25	21,2	10	8,6
7	5	5	4,2	30	25,8
8	5	25	21,2	30	25,8
9(X)	1,37	15	12,7	20	17,2
10(X)	5,62	15	12,7	20	17,2
11(X)	3,5	15	12,7	5,85	5,0
12(X)	3,5	15	12,7	34,14	29,4
13(X)	3,5	0,85	0,72	20	17,2
14(X)	3,5	29,14	24,7	20	17,2
15 (C)	3,5	15	12,7	20	17,2
16 (C)	3,5	15	12,7	20	17,2
17(C)	3,5	15	12,7	20	17,2
18(C)	3,5	15	12,7	20	17,2

O planejamento experimental foi realizado com 3 fatores, sendo dois níveis cada um, 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C) e 6 axiais (9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x), a 120°C, com 30 minutos de pré-tratamento ácido, e 24 horas de hidrólise enzimática a 50°C

#### 4.2 SELEÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE SACARIFICAÇÃO

A seleção da melhor condição de sacarificação foi dada a partir dos dados obtidos do planejamento DCCR para a torta de polpa de macaúba.

#### 4.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO DA TORTA DE POLPA DE MACAÚBA EMPREGANDO A CONDIÇÃO SELECIONADA DE SACARIFICAÇÃO

A partir da condição selecionada no processo de sacarificação pelo planejamento DCCR foi obtido o hidrolisado da torta de polpa da macaúba, o qual foi submetido à filtração

a vácuo. Parte do filtrado do hidrolisado obtido foi submetido a tratamento de destoxificação, como descrito a seguir e o sólido retido no filtro foi caracterizado quanto ao teor de açúcar.

#### **4.4 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO DA TORTA DE MACAÚBA**

A partir do filtrado obtido, uma parte foi tratada com carvão ativado 5 % por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida o material foi submetido a filtração a vácuo. A fim de inferir a eficiência do processo empregado para destoxificação, procedeu-se a quantificação indireta dos inibidores da fermentação presentes no hidrolisado, através da determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). A medida foi realizada no hidrolisado antes e depois do tratamento com carvão ativado. Os resultado foi expresso em mg de compostos fenólicos por litro de hidrolisado.

### **5 TESTE DE FERMENTABILIDADE**

Para a realização do teste de fermentabilidade foram preparados meios de fermentação composto por hidrolisado (destoxificado e não destoxificado) e meio sintético, sendo o hidrolisado a única fonte de carbono, em frascos cônicos com capacidade para 250mL, conforme descrito a seguir.

Frascos 1 e 4 – Constituído de Meio de fermentação com 25% do hidrolisado não destoxificado e 75% de meio sintético.

Frascos 2 e 5 – Constituído de Meio de fermentação com 50% do hidrolisado não destoxificado e 50% de meio sintético.

Frascos 3 e 6 – Constituído de Meio de fermentação com 50% do hidrolisado destoxificado e 50 % de meio sintético.

Os hidrolisados e o meio sintético foram submetidos à autoclavação a 111°C, sendo o hidrolisado por 5 minutos e o meio sintético por 20 minutos.

#### **5.1 PREPARO DO INÓCULO**

Para o preparo dos inóculos procedeu-se como descrito a seguir

A levedura *S. cerevisiae* (FLEISCHMANN®), na forma desidratada foi adquirida no mercado local.

Inóculo com a levedura *P. stipitis* – A levedura foi doada pela Fundação André Tosello. A cepa de *P. stipitis* codificada como CCT-2616, foi reativada em meio sintético conforme Tabela 7.

**Tabela 7:** Composição do meio sintético usado na ativação de *P. stipitis*

Componentes	Concentração
D-xilose	20,0g/L
Uréia	1,25g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1g/L
Extrato de levedura	2,0g/L
Solução de sais e ácido cítrico	40mL/L

Fonte: PEREIRA JR.(1991) *apud* Oliveira (2010)

A ampola doada contendo a levedura liofilizada foi inoculada em 100mL de meio sintético em frascos cônicos de 250mL e incubada a 28°C sob agitação (140rpm). Após 48 horas de crescimento, o meio contendo a suspensão de levedura foi preservada em glicerol a 10% e estocada em microtubos de 2mL a -18±1°C. Para inóculo no meio de fermentação, um microtubo contendo a cultura foi inoculado novamente em 100mL de meio sintético em frasco cônico de 250mL e incubado a 28°C sob agitação (140rpm) por 24 horas.

Para determinação do inóculo foi construída previamente uma curva padrão relacionando massa seca de células à absorbância determinada com leitura a 570nm. Durante 28 horas de crescimento nas condições descritas, foram retiradas alíquotas de 1mL, as quais foram submetidas à centrifugação por 7 minutos a 10.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 2mL de água destilada foi submetido determinação espectrofotométrica a 570nm. Após as 28 horas de crescimento, para determinação da curva de peso seco, o meio restante (60mL) foi centrifugado a 2000rpm por 20 minutos e ressuspensão em 60mL de água. Em seguida foram realizadas diluições de até 25 vezes gerando pontos com absorbância de 0 a 0,6. O volume das diluições foi de 50mL as quais foram filtradas sob vácuo em membrana de poliacetato com porosidade de 0,45µm, previamente desumificada e com peso conhecido. A membrana filtrante contendo a biomassa foi submetida a secagem em estufa a 85°C até peso constante. O cálculo da massa seca se deu pela diferença do peso da membrana filtrante contendo a biomassa, após a secagem em estufa e membrana filtrante desumificada sem biomassa. Os resultados foram expressos em g<sub>biomassa</sub>/L de meio de crescimento.

## 5.2 PREPARO E INÓCULO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Os seis frascos de hidrolisados descritos no item 5 da seção material e método constituíram-se nos meios de fermentação. Os frascos 1, 2 e 3 foram inoculados com a levedura *P. stipitis*. O inóculo foi de 25mg de biomassa por frasco contendo 75 mL de meio.

Os frascos 4, 5 e 6, foram inoculados diretamente com 25mg da levedura *S. cerevisiae* desidratada.

Na Tabela 8 encontram-se de forma resumida as condições de meio e inóculo para o processo fermentativo.

**Tabela 8:** Composição dos meios de fermentação e agentes fermentativos (*P. stipitis* e *S. cerevisiae*)

Frascos	Hidrolisado (%)		Meio Sintético (%)	Leveduras para Inoculo
	D	ND		
1	-	25	75	<i>Pichia stipitis</i>
2	-	50	50	<i>Pichia stipitis</i>
3	50	-	50	<i>Pichia stipitis</i>
4	-	25	75	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	-	50	50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6	50	-	50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

D = destoxificado, ND = não destoxificado

## 5.3 VARIÁVEIS DE RESPOSTA DO PROCESSO FERMENTATIVO

Os meios de fermentação inoculados com *P. stipitis* e *S. cerevisiae* foram monitorados conforme descrito a seguir.

O processo fermentativo utilizando como agente fermentativo levedura *P. stipitis* foi conduzido por até 72 horas. O frasco 1 teve o processo conduzido por 38 horas, enquanto os frascos 2 e 3 permaneceram até 72 horas. A partir destes processos foram retiradas alíquotas de 1mL a cada 2 horas. As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 10.000rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi congelado para análise de AR e glicose. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e analisado quanto à sua concentração de biomassa por espectrofotometria a 570nm.

O processo fermentativo conduzido com *S. cerevisiae* teve sua fermentação monitorada por 27 horas em frascos com fermentômetros, como ilustrado na Figura 14. O

fermentômetro é um dispositivo que possibilita acompanhar o processo fermentativo por meio de sucessivas pesagens em intervalos de tempo regulares, sendo a perda de peso obtida, decorrente do desprendimento de  $\text{CO}_2$ . Os valores obtidos de  $\text{CO}_2$  são utilizados para estimar o etanol produzido e conseqüentemente a concentração de açúcares fermentescíveis existente na biomassa. (PANTOJA, 2006). A pesagem foi realizada a cada duas horas durante o período de 27 horas de fermentação. Amostras coletadas antes do início do processo fermentativo e após foram usadas para determinação do teor de açúcares redutores totais, açúcares redutores e glicose e etanol. Todas as determinações analíticas foram feitas em triplicata.



**Figura 14:** Fermentômetros acoplados em frascos cônicos contendo meio com diferentes concentrações de hidrolisado: 25% (a), 50% (b) de hidrolisado não destoxificado e 50% (c) de hidrolisado destoxificado.

### 5.3.1 Quantificação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)

A quantificação de AR seguiu a metodologia de Somogyi-Nelson, descrita por Soughtgate (1991). O método se baseia no fato dos glicídios redutores aquecidos em meio alcalino transformarem-se em enedióis que reduzem os íons  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , formando o óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Este óxido reduz o reativo arsênio molíbdico a óxido de molibdênio, de coloração azul, cuja intensidade é proporcional à quantidade de açúcar presente na amostra. A curva analítica utilizada para cálculo de AR e ART pode ser vista no apêndice.

### 5.3.2 Quantificação do Teor de Etanol

A quantificação da concentração de álcool no meio de fermentação foi determinada ao final do processo pelo método espectrofotométrico utilizando dicromato de potássio (ISARANKURA, 2007). Para quantificação do teor de álcool uma alíquota de 5mL do meio foi submetida à destilação em microdestilador (Marca Tecnal, modelo TE-012), sendo

recolhida uma fração de 10mL, a qual foi submetida à quantificação de etanol. Para o doseamento, em tubo de ensaio com capacidade para 10mL, foi adicionado uma alíquota de 300µL do destilado ao qual foram adicionados 3mL de uma solução de dicromato de potássio a 0,1M preparada em solução de ácido sulfúrico a 5,0M, e deixado em repouso por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrofotometria a 590nm. A curva analítica de álcool foi construída com pontos de 0; 7,5; 15; 22,5; 30; 37,5 g/L..

### 5.3.3 Quantificação de glicose

A quantificação da glicose se deu pelo método enzimático Glicose Oxidase-Peroxidase (GOD-POD). Para o doseamento foram adicionados 10µL de amostra e 1mL do reativo enzimático em tubos tipo Eppendorf, seguido de aquecimento em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Como padrão foi usada uma solução de 1,0g/L de glicose. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 505nm.

### 5.3.4 Fator de rendimento de produção ( $Y_{P/S}$ )

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

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_i}{(S - S_i)} = \frac{P}{S_i - S}$$

P = Concentração de produto final (g/L)

$P_i$  = Concentração de produto inicial (g/L)

S = Concentração de substrato final (g/L)

$S_i$  = Concentração de substrato inicial (g/L)

### 5.3.5 Produtividade volumétrica ( $Q_p$ )

A produtividade volumétrica foi calculada com base na fórmula abaixo. Foi expressa em gramas de etanol por litro de meio fermentado por hora ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ ).

$$Q_p = \frac{P \left(\frac{g}{L}\right)}{t \left(h\right)}$$

P= quantidade de produto (etanol) em 1L

t= tempo em horas

### 5.3.6 Eficiência fermentativa (Ef)

Essa é uma relação que foi calculada usando a relação entre rendimento em produto do processo ( $Y_{p/s}$ ) e o rendimento teórico (0,511g de etanol/g de açúcar) :

$$Ef = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \times 100$$

Ef= Eficiência fermentativa em %

$Y_{p/s}$  = Fator de rendimento de produção

### 5.3.7 Fator de rendimento de célula em relação ao substrato ( $Y_{x/s}$ )

O fator de rendimento em célula foi calculado em g de célula por g de açúcares totais consumidos (g/g)

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X - X_0}{-(S - S_0)}$$

X= massa celular final (g/L)

$X_0$ = massa celular inicial (g/L)

S= concentração de substrato final (g/L)

$S_0$ = concentração de substrato inicial (g/L)

### 5.3.8 Taxa específica de crescimento celular ( $\mu$ )

Este parâmetro cinético expressa a taxa específica de crescimento, a qual é calculada de acordo com seguinte expressão.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t$$

X= massa celular final (g/L)

$X_0$ = massa celular inicial (g/L)

t = tempo (fase exponencial)

### 5.3.9 Tempo de geração ( $t_g$ )

Para o cálculo do tempo de duplicação foram usadas as seguintes fórmulas abaixo:

$$tg = \frac{t}{n}$$

$$X = X_0 \times 2^n$$

$$\log X = \log X_0 + n \log 2$$

$$\log X = \log X_0 + n \cdot 0,301$$

$$\log X - \log X_0 = n \cdot 0,301$$

$$n = (\log X - \log X_0) / 0,301$$

$$n = 3,3(\log X - \log X_0)$$

Onde:  $t_g$  = tempo de geração ou duplicação

$t$  = variação de tempo considerado para o cálculo (fase exponencial)

$n$  = n° de gerações

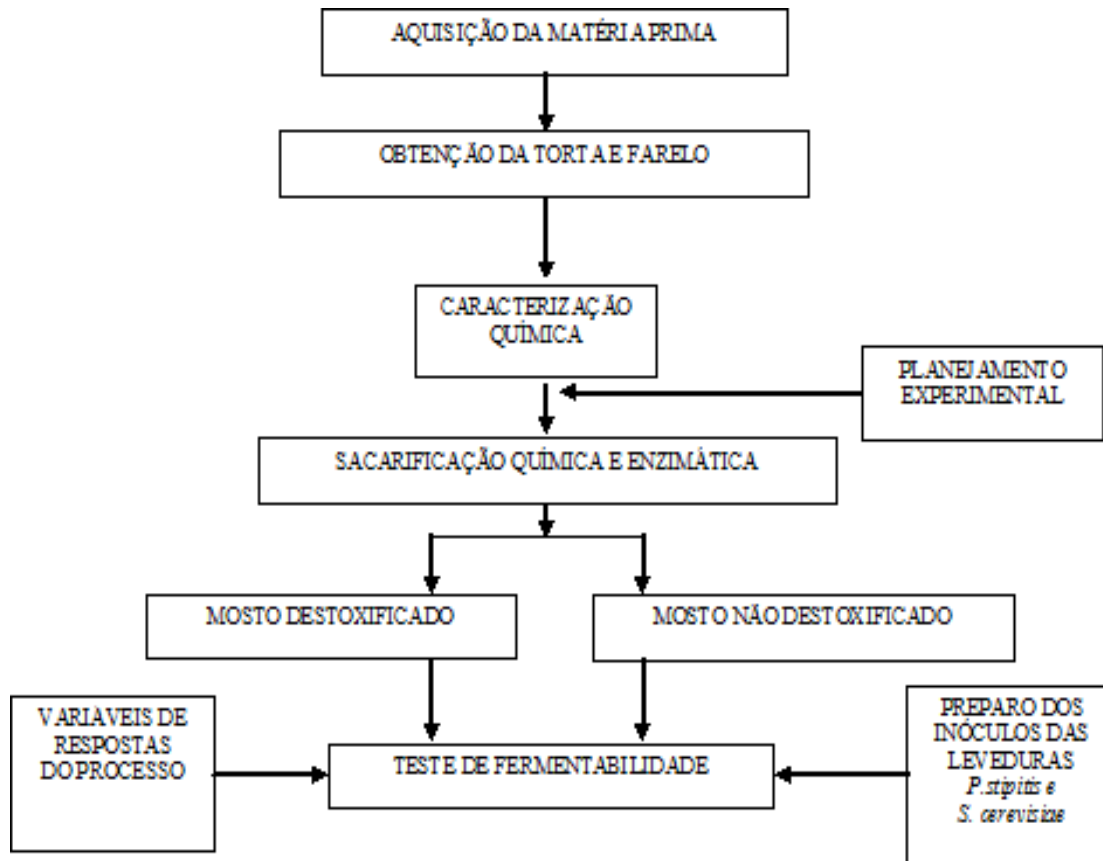
$\log X$  = logaritmo da concentração de biomassa final

$\log X_0$  = logaritmo da concentração de biomassa inicial

### 5.3.10 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a extração dos compostos fenólicos foi usada uma solução de metanol 80%. Utilizou-se uma quantidade de 400 $\mu$ L de amostra e adicionou-se 400 $\mu$ L da solução de Folin Ciocalteau e 3.6mL de água. Deixar em repouso por 5 minutos e adicionar 4mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e completar o volume com água destilada para 10mL. Deixar em repouso por 90 minutos. Em seguida analisar em espectrofotômetro a 750nm de comprimento.

As etapas descritas anteriormente no item Materiais e Métodos podem ser visualizadas no fluxograma apresentado a seguir (Figura 15).

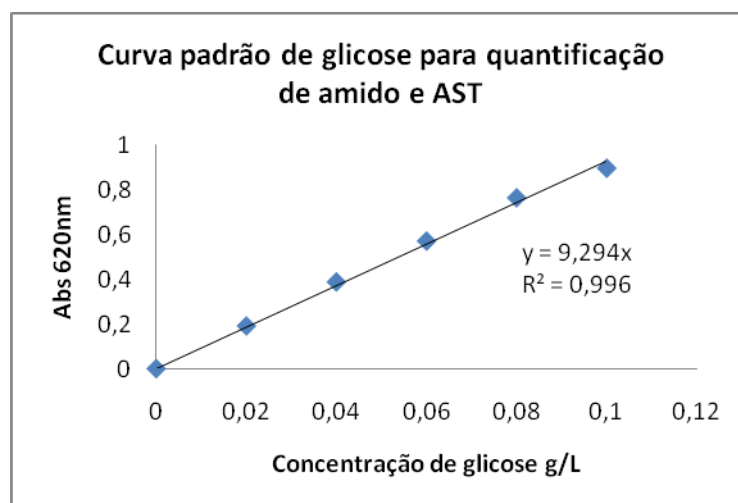


**Figura 15:** Fluxograma das atividades realizadas no item Materiais e Métodos.

## PARTE V RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA TORTA DE MACAÚBA

O resultado da caracterização química da torta de macaúba está apresentado na Tabela 9. Observou-se que o teor de açúcares da torta desengordurada quando comparada a torta não desengordurada apresentou um aumento de 9,12 %. Esse fato deve-se a retirada dos lipídeos durante o processo de extração de óleo com solvente, que finda por concentrar os constituintes presentes na biomassa. A torta da polpa de macaúba apresentou um teor de 23,37% de amido, mostrando que o fruto é uma rica fonte deste carboidrato. A curva analítica utilizada na quantificação de amido está apresentada na Figura 16



**Figura 16:** Curva analítica de D-glicose para quantificação de amido e açúcares solúveis totais das amostras de torta/farelo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, percebe que a torta de macaúba depois de desengordurada apresentou um teor de 4,7% de lipídeos, o que demonstra que o método de extração com éter etílico foi bom, rendendo uma extração aproximadamente 80% da quantidade de óleo inicial.

**Tabela 9:** Caracterização das tortas de macaúba

Parâmetros	Torta			
	Íntegra		Desengordurada	
	Média (%)	DP	Média (%)	DP
Umidade	2,52	0,14	7,8	0,23
Lipídeos	21,5	1,0	4,7	0,15
Cinzas	4,84	0,1	4,19	0,16
Proteína Bruta	6,35	0,05	8,15	0,01
AST	8,19	0,63	11,48	0,62
Amido	23,37	0,5	23,16	0,95
Fibra Bruta	8,7	0,3	10,46	0,2
FDA	11,7	0,25	14,12	0,91
FDN	21,1	0,3	23,72	0,36
Celulose	10,08	0,8	11,49	1,08
Hemicelulose	9,43	0,15	9,6	0,79
Lignina	0,38	0,04	4,33	0,12

DP = desvio padrão, AST= Açúcares solúveis totais, FDA= Fibras solúveis em detergente ácido, FDN= Fibras solúveis em detergente neutro  
Torta íntegra e torta desengordurada com éter etílico (torta imersa em éter por 48 horas).

## 2 PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO

A sacarificação da torta de macaúba foi realizada inicialmente e avaliada através de planejamento experimental fatorial do tipo  $2^{n-1}$ . Os resultados dos ensaios de sacarificação nas condições desenhadas pelo planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 10. De acordo com MONTGOMERY (2004), o planejamento experimental fatorial do tipo  $2^{n-1}$  é abrangente e útil para obter informações prévias para um posterior planejamento. O coeficiente de determinação obtido para o fator de resposta açúcares redutores foi de 0,94, considerando um nível  $p = 0,1$ . Na Figura 17 podem ser observados aqueles fatores que exerceram efeitos significativos para o processo hidrolítico em consideração.

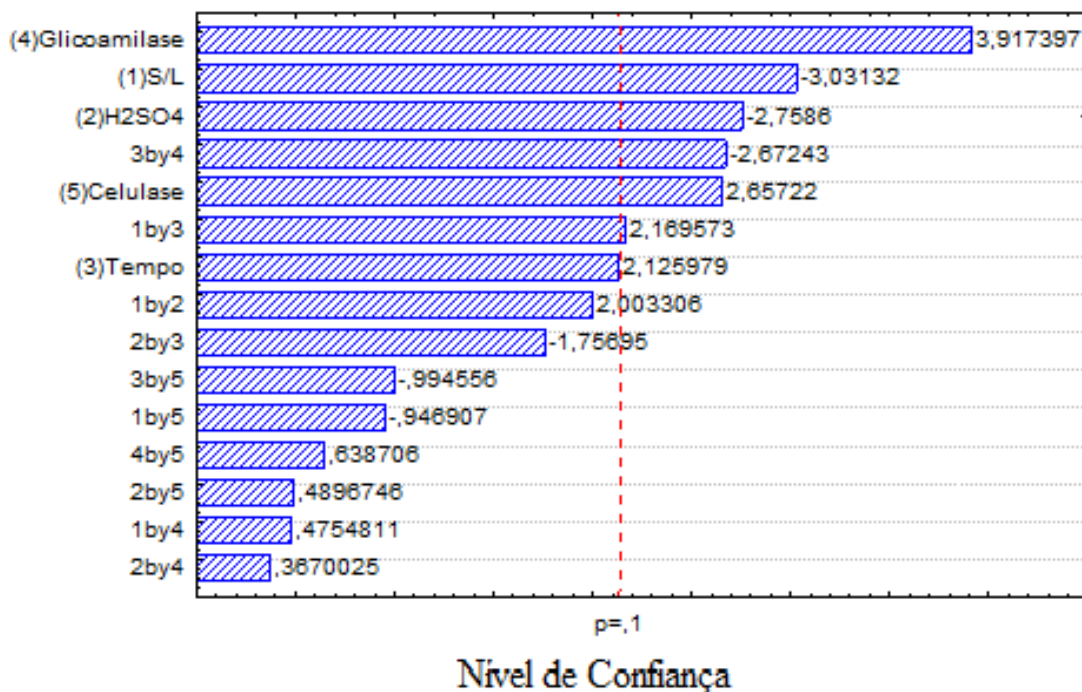
**Tabela 10:** Fator de resposta para a hidrólise quimio-enzimática da torta de macaúba obtida por planejamento experimental do tipo  $2^{n-1}$  com dois níveis, 5 fatores e 4 pontos centrais.

Amostra	Pré-tratamento			Hidrólise enzimática				AR%
	S/L	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tempo	Amiloglicosidade		Celulase		
	(%)	(%)	(min)	μL/g torta	AGU/g torta	μL/g torta	EGU/g torta	
1	20	2	20	10	8,6	100	85	45,68
2	50	2	20	10	8,6	10	8,5	20,52
3	20	8	20	10	8,6	10	8,5	27,6
4	50	8	20	10	8,6	100	85	27,18
5	20	2	60	10	8,6	10	8,5	50,39
6	50	2	60	10	8,6	100	85	43,47
7	20	8	60	10	8,6	100	85	38,27
8	50	8	60	10	8,6	10	8,5	36,18
9	20	2	20	100	86	10	8,5	49,72
10	50	2	20	100	86	100	85	42,5
11	20	8	20	100	86	100	85	56,13
12	50	8	20	100	86	10	8,5	37,63
13	20	2	60	100	86	100	85	56,61
14	50	2	60	100	86	10	8,5	46,25
15	20	8	60	100	86	10	8,5	33,43
16	50	8	60	100	86	100	85	44,3
17 (C)	35	5	40	55	47,3	55	46,8	46,13
18 (C)	35	5	40	55	47,3	55	46,8	45,87
19 (C)	35	5	40	55	47,3	55	46,8	47,64
20 (C)	35	5	40	55	47,3	55	46,8	46,16

Observou-se na Figura 17 o efeito negativo da razão sólido/líquido (S/L) sobre a sacarificação. A concentração ideal encontrada da razão S/L foi de 20 %. O declínio pode estar relacionado a uma dificuldade de transferência de massa, pois quanto maior a quantidade de sólidos presentes, menor a disponibilidade do substrato para a ação das enzimas. O mesmo efeito negativo foi observado para a concentração de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), este fato pode estar atrelado a formação de furfural e hidroximetilfurfural gerados durante a desidratação dos açúcares que ocorre em pH ácido (HAGERDAL, 2000). Os dados obtidos sugerem que em concentrações acima de 2% de ácido sulfúrico tenha ocorrido desidratação dos açúcares presentes, ocasionando um decréscimo do mesmo no meio de reação.

Em relação ao fator tempo do pré tratamento, percebeu-se uma contribuição negativa na interação tempo e glicoamilase (3by4 na Figura 20). Esse efeito provavelmente está relacionado com a desidratação dos açúcares, uma vez que os açúcares estando em contato

com o ácido por mais tempo aumento, irão gerar furfural e hidroximetilfurfural, diminuindo a quantidade de substratos da enzima



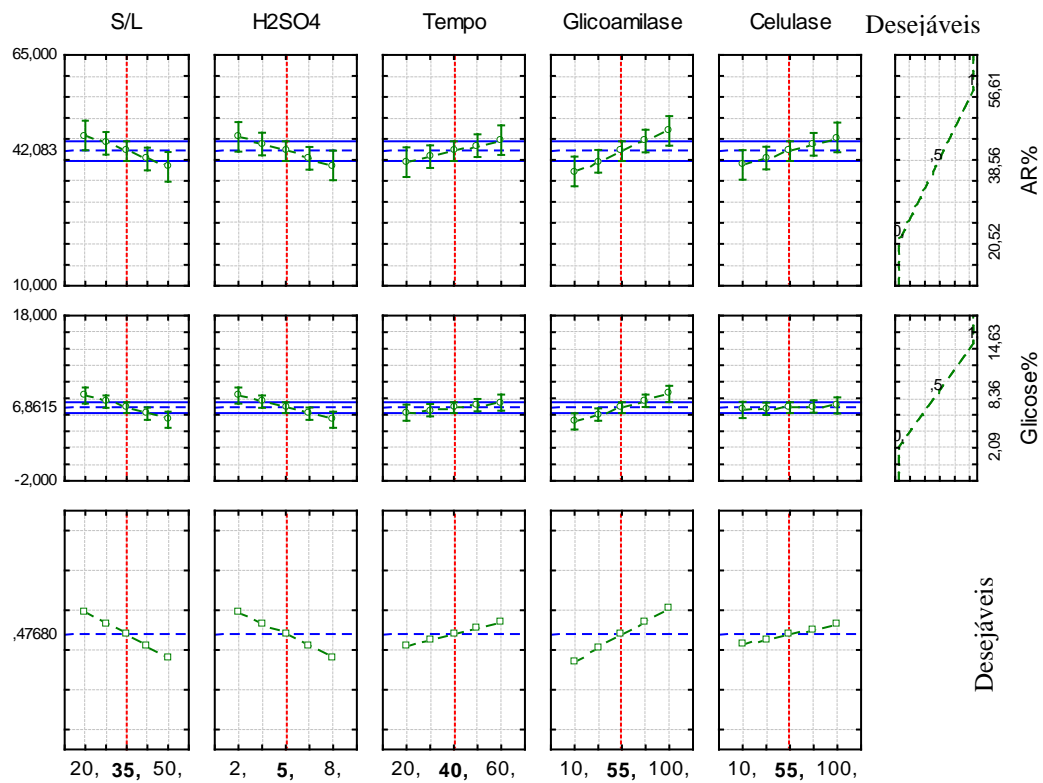
**Figura 17:** Gráfico de Pareto com os efeitos dos fatores avaliados sobre o processo de hidrólise enzimática da torta de macaúba. Nível de confiança de 90%

Em relação às enzimas amiloglicosidade (glicoamilase) e celulase, observou-se que o aumento das suas concentrações teve um efeito positivo sobre a concentração de açúcares redutores. Esse efeito pode ser explicado pela ação hidrolítica de tais enzimas que geram AR e glicose a partir de oligossacarídeos. Foi possível observar ainda que o aumento da concentração da enzima amiloglicosidade gerou maior concentração de açúcar redutor do que um aumento da concentração da enzima celulase, isso provavelmente se deve ao fato da biomassa possuir um teor de amido maior do que o de celulose. Ressalta-se que o tempo de hidrólise enzimática foi de 24 horas, e que este tempo foi definido em pré-testes conforme resultados apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Rendimento de AR produzido em função do tempo de hidrólise enzimática da torta da polpa de macaúba

Amostra	Tempo de hidrólise Enzimática (h)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	S/L (%)	Amiloglicosidade		Celulase		AR %
				μL/g torta	AGU/g torta	μL/g torta	EGU/g torta	
1	24	3,5	15	30	25,8	25	21.2	23,29
2	48	3,5	15	30	25,8	25	21.2	23,86
3	72	3,5	15	30	25,8	25	21.2	26,85
4	96	3,5	15	30	25,8	25	21.2	21,03
5	120	3,5	15	30	25,8	25	21.2	24,49

O exame do gráfico de repostas desejáveis (Figura 18) permitiu distinguir a contribuição de cada fator para o processo de sacarificação. Ficou evidente que a contribuição negativa da razão S/L limitou o processo de sacarificação. O efeito negativo da concentração do ácido também se mostrou importante. O tempo de pré-tratamento não se mostrou significativo para os intervalos pesquisados. Já as enzimas apresentaram uma contribuição positiva, de forma que foi usada uma quantidade inferior da melhor condição encontrada na Figura 21, que foi de 55μL/g de torta, o que equivale a 47,3 AGU e 46,8 EGU, visando resultados expressivos com quantidade menor de enzimas. Tais efeitos e as contribuições das concentrações das enzimas permitiram inferir as condições hidrolíticas mais favoráveis para a conversão dos polissacarídeos: razão sólido/líquido de 20%; concentração de ácido sulfúrico de 2,0%; tempo ideal para pré-tratamento ácido, 40 minutos.



**Figura 18:** Gráficos das respostas previstas pelo modelo fatorial  $2^{5-1}$  e os respectivos padrões de ‘desejabilidade’.

Os resultados preliminares obtidos com o planejamento fatorial  $2^{n-1}$  serviram de base para a proposição de um desenho experimental do tipo DCCR, que permitisse a otimização do processo de sacarificação, mantendo constantes a razão S/L (20%) e o tempo do pré-tratamento (40 minutos), conforme mostrado na Tabela 12.

**Tabela 12:** Fatores de resposta do planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup> para a hidrólise químico-enzimática da torta de macaúba.

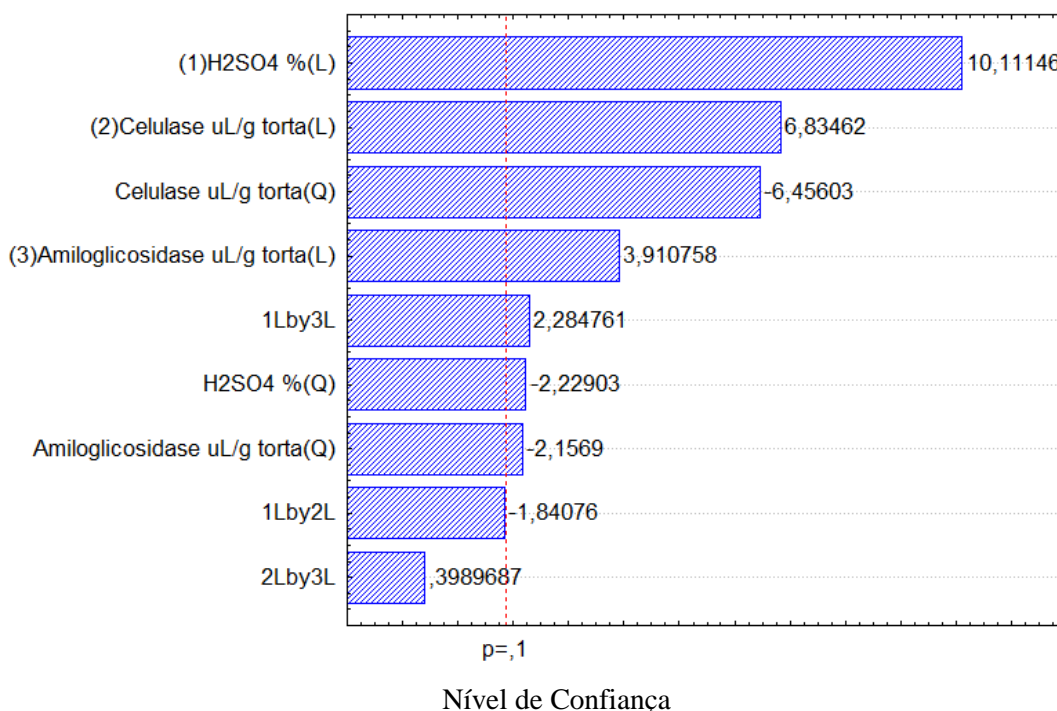
Amostra	%H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Celulase		Amiloglicosidase		%AR	% Glicose
		μL/g torta	EGU/g torta	μL/g torta	AGU/g torta		
1	2,00	5,00	4,2	10,00	8,6	36,80	21,71
2	2,00	25,00	21,2	10,00	8,6	41,93	26,71
3	2,00	5,00	4,2	30,00	25,8	37,33	24,57
4	2,00	25,00	21,2	30,00	25,8	42,91	26,30
5	5,00	5,00	4,2	10,00	8,6	42,76	14,27
6	5,00	25,00	21,2	10,00	8,6	45,08	28,54
7	5,00	5,00	4,2	30,00	25,8	46,47	23,14
8	5,00	25,00	21,2	30,00	25,8	49,52	30,28
9(x)	1,37	15,00	12,7	20,00	17,2	39,92	21,92
10(x)	5,62	15,00	12,7	20,00	17,2	47,78	23,96
11(x)	3,50	15,00	12,7	5,85	5,0	42,41	23,65
12(x)	3,50	15,00	12,7	34,14	29,4	45,41	26,20
13(x)	3,50	0,85	0,72	20,00	17,2	37,88	24,16
14(x)	3,50	29,14	24,7	20,00	17,2	43,70	28,85
15(c)	3,50	15,00	12,7	20,00	17,2	47,11	24,57
16(c)	3,50	15,00	12,7	20,00	17,2	46,51	24,97
17(c)	3,50	15,00	12,7	20,00	17,2	46,01	24,67
18(c)	3,50	15,00	12,7	20,00	17,2	47,48	24,46

Planejamento com 3 fatores, sendo dois níveis cada um, 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C) e 6 axiais (9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x), com as seguintes condições experimentais: temperatura de hidrólise por autoclavagem de 120°C, pressão de 1 atm, tempo de hidrólise química de 30 minutos, tempo de hidrólise enzimática de 24 horas e fatores de resposta AR e da Glicose.

De acordo com o planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup>, cujo coeficiente de determinação calculado foi de 0,92, a condição que apresentou maior porcentagem de AR e glicose liberada foi a condição 8, onde foi empregado uma hidrólise química na concentração de 5% de ácido sulfúrico, e concentração de celulase de 21,2 EGU e 25,8 AGU para amiloglicosidase. No entanto, ao comparar essa condição com as demais condições deste planejamento experimental, a que se apresentou como mais vantajosa foi a condição relativa aos pontos centrais. Pois, os pontos centrais foram construídos com concentração de ácido sulfúrico, 30% menor que na condição 8. Além disso, a concentração de enzima celulase utilizada foi em torno de 30% menor, e ainda assim, conseguiu atingir uma porcentagem de AR em torno de 47% (aproximação da média das 4 condições centrais) e 25% de glicose. Isso significa que a diferença entre o rendimento dos pontos centrais em relação com a condição 8, não foi superior a 5% para o teor de AR e 16% para glicose.

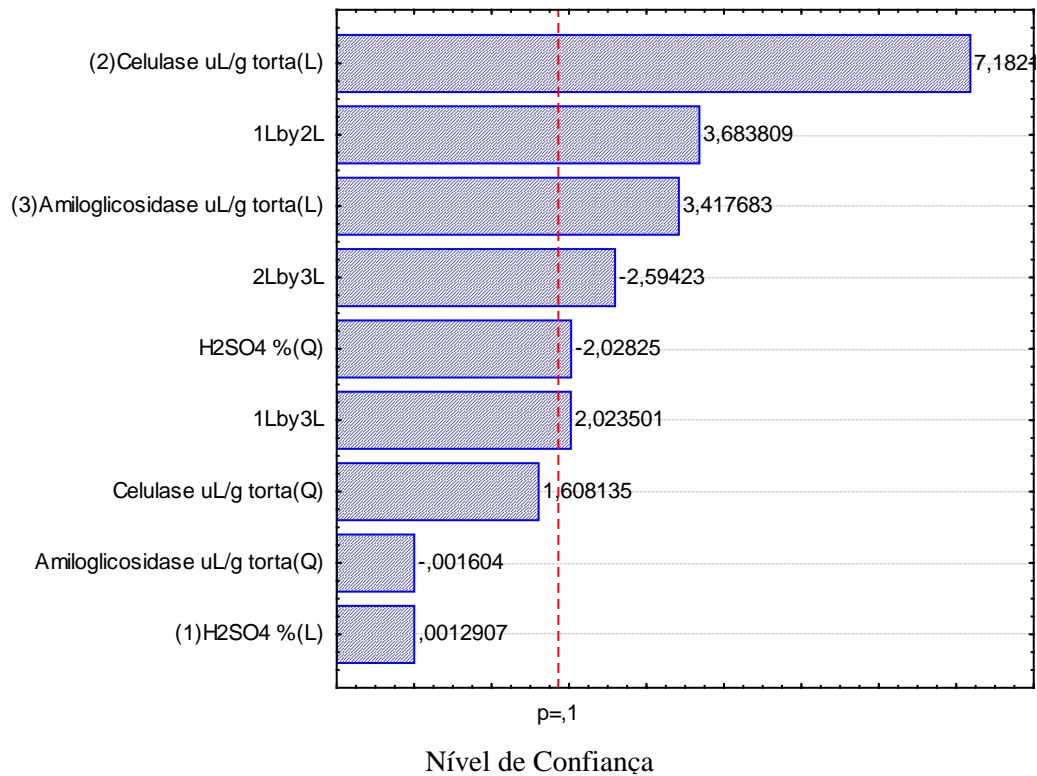
Os fatores que tiveram contribuições no planejamento estão demonstrados no gráfico de Pareto, representado na Figura 19. Pelo gráfico de Pareto pode-se observar que houve

efeito linear significativo para a concentração de ácido sulfúrico e para as concentrações de celulase e amiloglicosidase, que contribuíram de maneira positiva para o processo. Além disso, observou-se que o efeito quadrático do ácido sulfúrico e das enzimas celulase e amiloglicosidase são negativos, o que sugere uma otimização desses fatores.



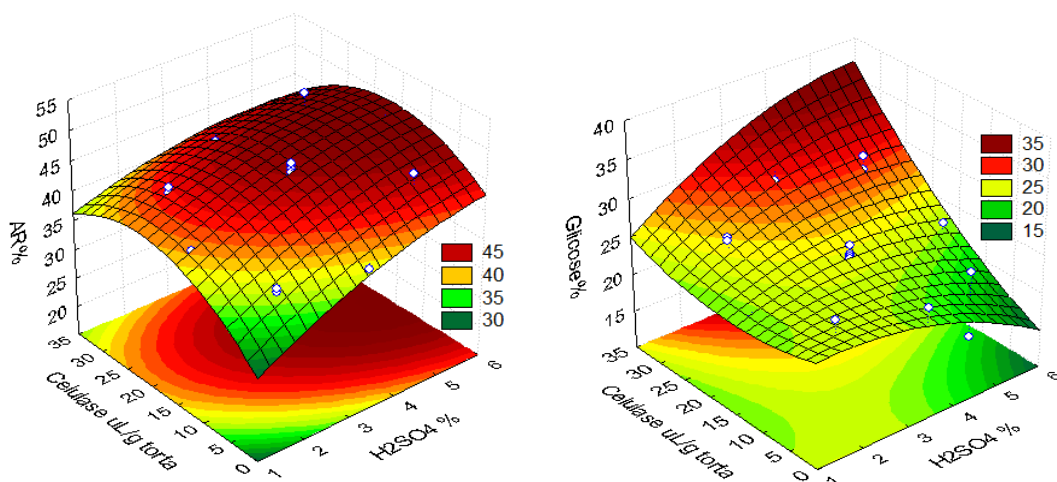
**Figura 19:** Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados no planejamento DCCR sobre a liberação de açúcares redutores. Nível de Confiança de 90%

No gráfico de Pareto apresentado na Figura 20 estão apresentados os fatores que contribuíram na produção de glicose e por meio destes, pôde-se perceber que o efeito linear da celulase e da amiloglicosidase foram positivos, o que provavelmente pode ser explicado pelo crescimento progressivo da quantidade das enzimas utilizadas. O efeito quadrático negativo do ácido sulfúrico presente no diagrama de Pareto, deve-se, provavelmente, a desidratação da glicose causada pela presença do ácido sulfúrico, gerando furfurais e derivados, causando diminuição no teor de açúcar ao final do processo. As combinações, dos fatores ácido sulfúrico/celulase e ácido sulfúrico/amiloglicosidase apresentaram efeito positivo no processo de obtenção da glicose. Esse efeito deve-se provavelmente, a presença de ácido sulfúrico que promove a hidrólise de oligossacarídeos, gerando substratos para a atuação das duas enzimas, contribuindo assim, para o aumento do teor de glicose no meio de reação.



**Figura 20:** Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores avaliados no planejamento DCCR sobre a liberação de glicose. Nível de Confiança de 90%

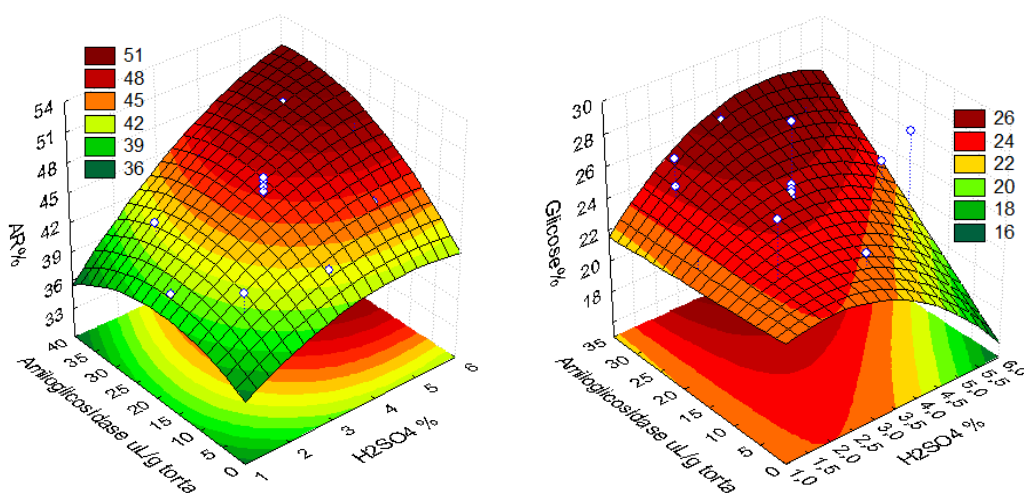
Por meio do gráfico de superfície resposta para produção de AR e Glicose (Figura 21) foi possível observar o efeito combinado da ação hidrolítica da enzima celulase e do ácido sulfúrico.



**Figura 21:** Gráfico de superfície resposta para o efeito combinado da enzima celulase ( $\mu\text{L/g}$  torta) e % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sobre os açúcares liberados.

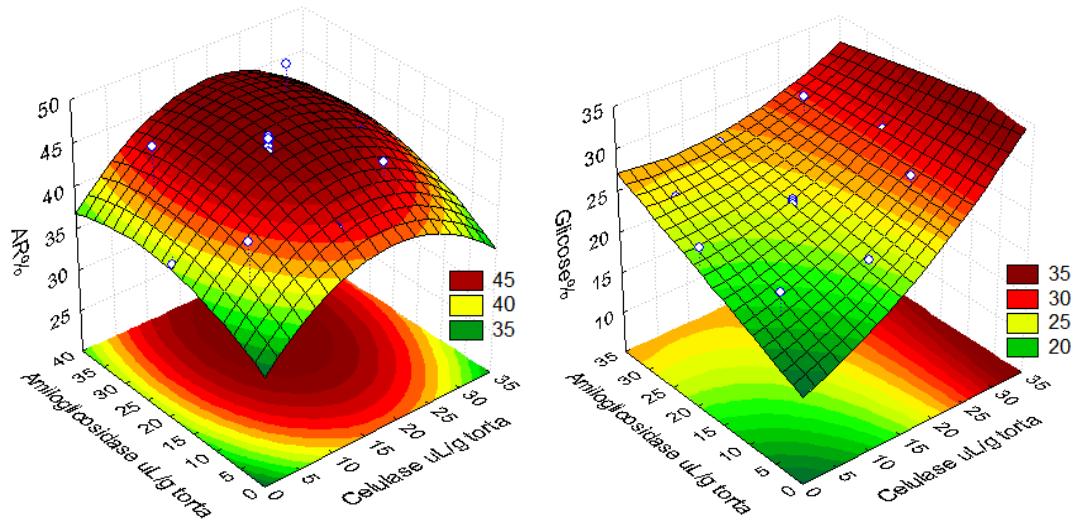
Ácido sulfúrico e celulase apresentaram efeitos sinérgicos significativos para o processo hidrolítico (Figura 21), resultando em concentrações crescentes de açúcares

reduzidores e glicose. No entanto, o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  também apresentou um efeito quadrático negativo sobre a concentração de glicose, o que impõe limite ao incremento do ácido (Figura 21). Na Figura 22 também é possível observar o efeito sinérgico entre o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e a enzima amiloglicosidase, de forma a incrementar a formação de açúcares redutores. Por outro lado, na mesma figura, verifica-se o efeito negativo do ácido sulfúrico sobre a concentração de glicose. Por certo, a glicose liberada durante o pré-tratamento, principalmente derivada da fração amilácea, mais susceptível ao ataque ácido, foi também alvo de desidratação a hidroximetilfurfural.

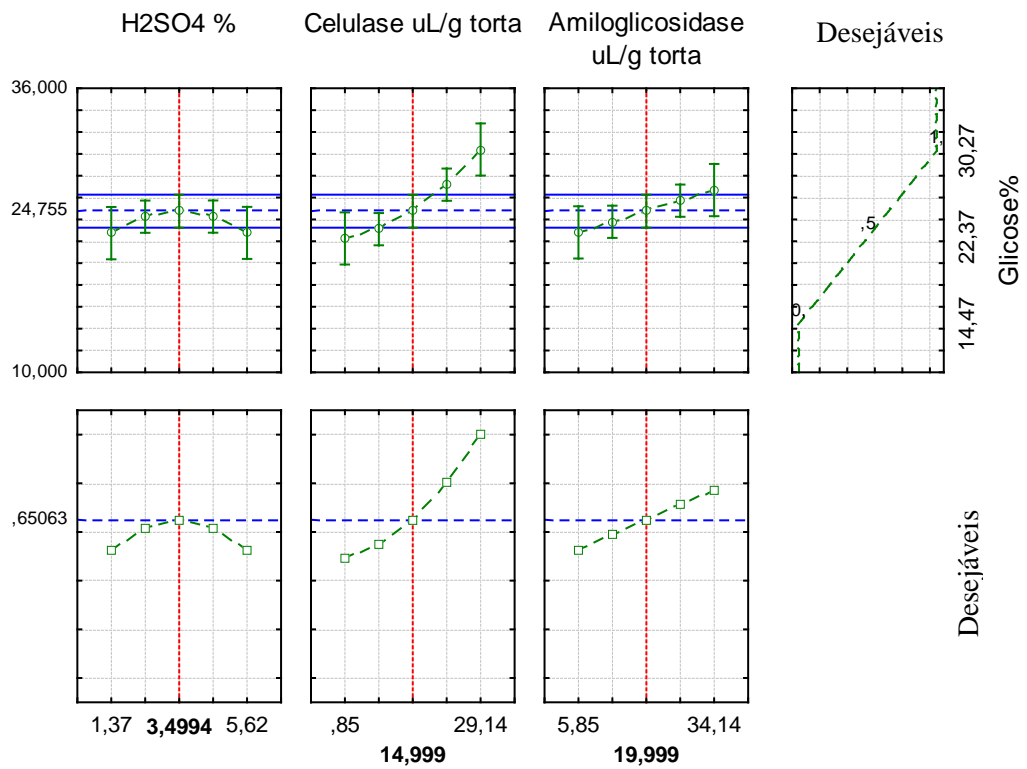


**Figura 22:** Gráficos de superfície de resposta para % de AR e Glicose % em função da concentração da enzima amiloglicosidase ( $\mu\text{L/g}$  torta) e da concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

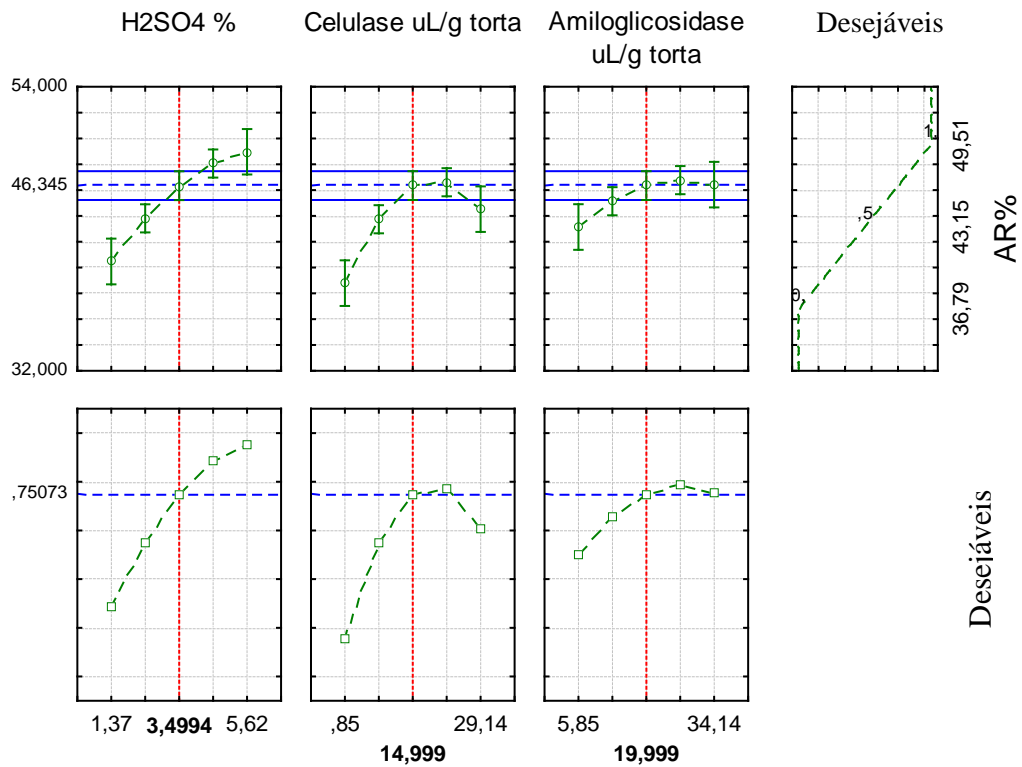
Na Figura 23 está apresentada a relação do efeito combinado entre as concentrações das enzimas amiloglicosidase e celulase. A intersecção das concentrações das enzimas ( $15\mu\text{L/g}$  de torta para enzima celulase e  $20\mu\text{L/g}$  torta para enzima amiloglicosidase) se dá no ápice da curvatura do gráfico de superfície resposta para o fator de resposta AR%. Isso significa que a partir deste ponto qualquer aumento na concentração das duas enzimas não contribuirá para o incremento do processo. Por outro lado, o gráfico que associa o efeito das enzimas sobre a liberação de glicose denota que o processo de liberação de glicose a partir da celulose presente na biomassa é mais lento ou resiliente.



**Figura 23:** Gráficos de superfície de resposta para % de AR e % de Glicose em função das concentrações de amiloglucosidase ( $\mu\text{L/g}$  torta) e de celulase ( $\mu\text{L/g}$  torta).



**Figura 24:** Gráficos das respostas previstas pelo modelo fatorial DCCR e os respectivos padrões de ‘desejabilidade’ para o fator de resposta Glicose%.



**Figura 25:** Gráficos das respostas previstas pelo modelo DCCR e os respectivos padrões de ‘desejabilidade’ para o fator de resposta AR%.

Em consideração aos gráficos de ‘desejabilidade’ (Figuras 24 e 25) foram definidas as concentrações dos fatores que seriam usados para a sacarificação semi-preparativa destinada aos experimentos de fermentabilidade. Considerando o efeito quadrático negativo do ácido sulfúrico, foi adotada a concentração de 3,5%, limite a partir do qual já se observa decaimento da concentração de glicose (Figura 24). Em relação às enzimas, foram adotados 15 $\mu$ L da enzima celulásica /g de torta e 20 $\mu$ L de amiloglicosidase/g de torta. Sob tais condições foi possível obter uma eficiência de hidrólise de 92%.

Na Tabela 13 estão apresentados os teores de amido, hemicelulose e celulose da torta de macaúba antes e depois do processo de sacarificação realizado na condição apontada pelo delineamento experimental como a mais adequada. Os resultados obtidos evidenciam a eficiência do processo de sacarificação.

**Tabela 13:** Teores de amido, celulose e hemicelulose da torta de macaúba desengordurada antes e depois da sacarificação.

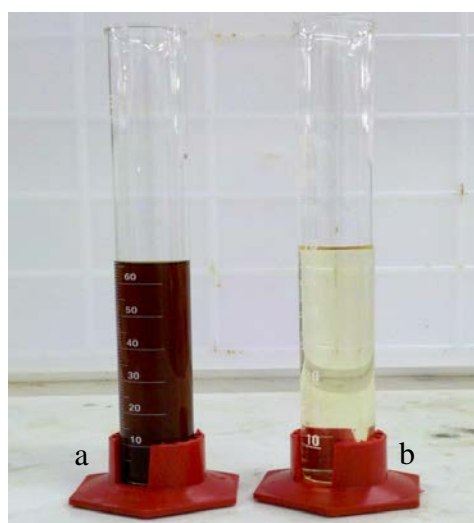
Parâmetros	Torta de Macaúba			
	Antes da sacarificação		Depois da sacarificação	
	Média (%)	DP	Média (%)	DP
<b>Amido</b>	23,16	0,95	0,34	0,18
<b>Celulose</b>	11,49	1,08	5,70	0,26
<b>Hemicelulose</b>	9,60	0,79	-0,26	1,24

Na Tabela 13 percebe-se que praticamente todo o amido presente na torta de macaúba foi hidrolisado. O mesmo ocorreu com a hemicelulose. Em relação à fração de celulose presente na torta de macaúba, cerca de 50% foi solubilizada. Uma análise crítica dos resultados obtidos com o planejamento DCCR, ilustrado pelas Figuras 24 e 25, e dos valores de polissacarídeos antes e depois do processo de sacarificação em condição pré-determinada pela análise dos resultados do processo de otimização, indica a possibilidade de um incremento da conversão da celulose presente na torta de macaúba se houver um incremento da concentração da celulase.

### 3 TESTE DE FERMENTABILIDADE

O filtrado do hidrolisado da torta de macaúba apresentou aspecto límpido, e com cor âmbar (Figura 26 a).

O processo de destoxificação do hidrolisado da torta de macaúba com carvão ativado resultou em um hidrolisado límpido e claro (Figura 26 b).

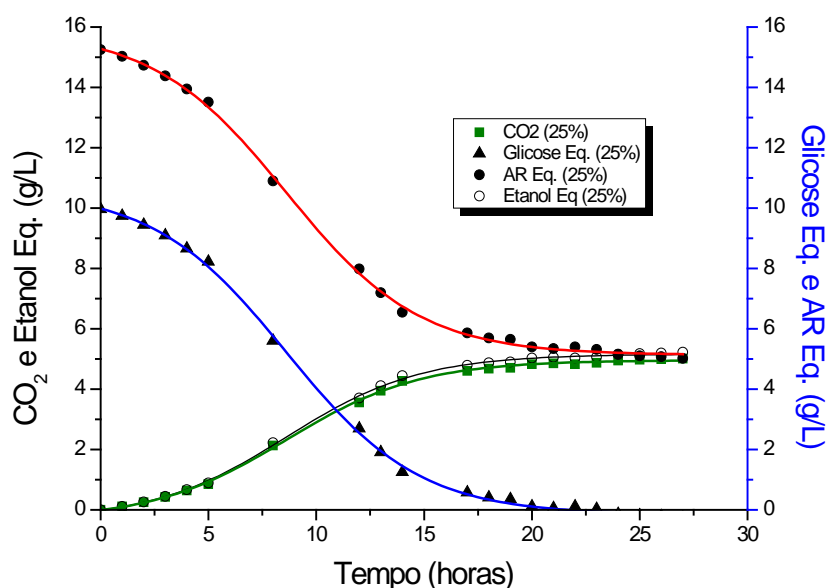


**Figura 26:** Meios hidrolisados não destoxificado (a) e destoxificado (b)

### 3.1 FERMENTAÇÃO COM *Saccharomyces cerevisiae*

Na Figura 27 estão ilustrados os perfis do consumo de glicose e açúcares redutores (AR) e produção de CO<sub>2</sub> e etanol do processo fermentativo do hidrolisado de torta de macaúba elaborado com 25% de hidrolisado não destoxificado e 75% de meio sintético (MH25) conduzido com *S. cerevisiae*.

Embora o processo fermentativo com *S. cerevisiae* tenha sido acompanhado pela evolução de CO<sub>2</sub>, percebeu-se que o final da fermentação coincidiu com o esgotamento da glicose disponível inicialmente. Ao mesmo tempo foi verificado que houve uma quantidade residual de açúcares redutores (4,8 g/L) correspondente à diferença entre a concentração de açúcares redutores e a concentração de glicose presentes no mosto no início do processo. Esse comportamento aponta para a existência de açúcares não fermentáveis para a levedura utilizada, como pentoses (HAGERDAL, 1994).



**Figura 27:** Perfil (Açúcares redutores=AR, glicose, gás carbônico= CO<sub>2</sub> e etanol) do processo fermentativo do hidrolisado de torta de macaúba elaborado com 25% de hidrolisado não destoxificado e 75% de meio sintético (MH25) conduzido com *Saccharomyces cerevisiae*.

A quantidade de etanol produzida foi de 5,38g/L. De acordo com a quantidade de álcool produzida observou-se que toda a glicose foi convertida em etanol. Considerando a quantidade inicial de açúcares redutores totais (ART) de 18,97g/L, a final de 6,40g/L (não representados na Figura 27, pois está expresso em AR, açúcares redutores), e o teor de etanol

produzido durante o processo, o rendimento ( $Y_{P/S}$ ) do processo fermentativo foi da ordem de 0,42. A eficiência fermentativa do processo foi de 82,2% e a produtividade volumétrica, considerando o período de 20 horas de fermentação (início da fase estacionária) foi de  $0,269\text{g/L.h}^{-1}$ .

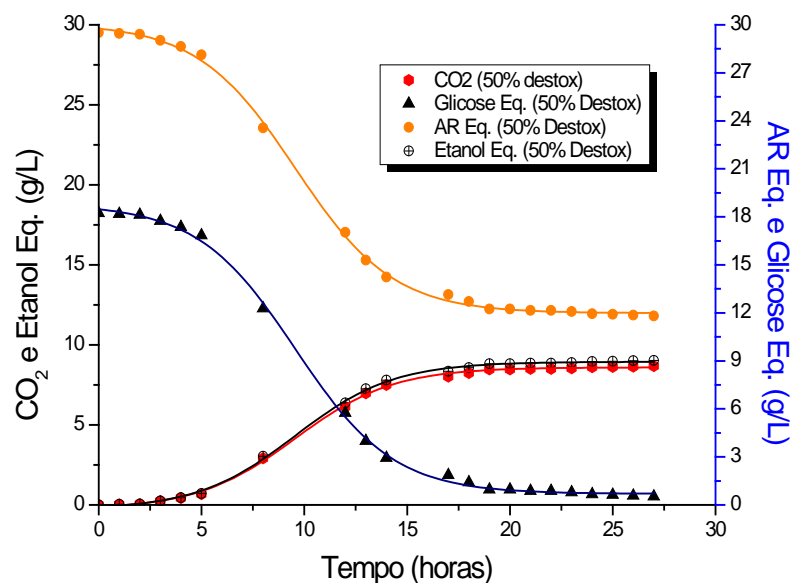
Na Tabela 14 estão reunidos os dados analíticos utilizados para calcular os fatores de resposta do processo fermentativo.

**Tabela 14:** Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio de fermentação com 25% de hidrolisado e 75 % de meio sintético, inoculado com a levedura *S. cerevisiae*.

Tempo (h)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Álcool (g/L)	$Y_{p/s}$ (gp/gs)	$Q_p$ (g/L.h <sup>-1</sup> )	$E_f$ (%)
0	18,97	10	0	0,42	0,27	82,2
20	6,4	0	5,38			

ART= Açúcares redutores totais,  $Y_{p/s}$  = rendimento de produção em etanol;  $Q_p$ = produtividade volumétrica e  $E_f$ = eficiência fermentativa.

No meio de cultura MH50D, Figura 28, observou-se que o consumo de glicose foi praticamente total em 24 horas de processo fermentativo, sendo sua concentração inicial de  $18,23\text{g/L}$ . A quantidade de etanol produzida foi de  $10,83\text{g/L}$ . Com base no teor de etanol produzido observou-se que toda a glicose foi convertida em etanol. Considerando a quantidade de açúcares redutores totais (ART) inicial de  $34,83\text{g/L}$ , a final de  $13,14\text{g/L}$  e o teor de etanol produzido durante o processo, o rendimento ( $Y_{P/S}$ ) do processo fermentativo obtido foi na ordem de 0,49. A eficiência fermentativa ( $E_f$ ) do processo foi de 97,7% e a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ), considerando o período de 20 horas de fermentação (início da fase estacionária) foi de  $0,54\text{g/L.h}^{-1}$ .



**Figura 28.** Perfil de consumo de AR Eq., glicose Eq. (g/L) e produção de CO<sub>2</sub> (g) e etanol Eq. em meio constituído por 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo.

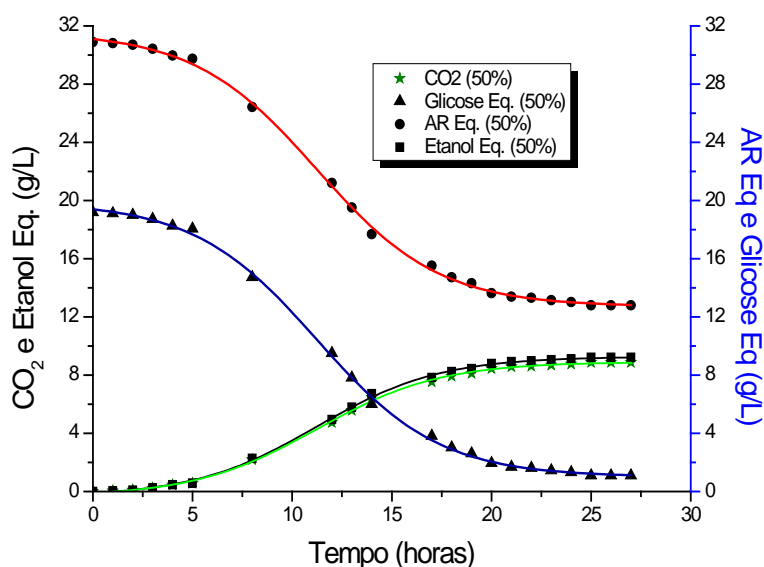
Na Tabela 15 estão apresentados os parâmetros do processo fermentativo para o meio hidrolisado MH50D. Com base em 7,5g de torta e no teor de etanol produzido por litro de hidrolisado a projeção de etanol produzida por tonelada de torta seria de 67L. OLSSON e HAGERDAL (1996), estudando hidrolisado de pinha não destoxificado como meio de fermentação inoculado com *S. cerevisiae* obteve uma produtividade volumétrica igual a 0,37g/L.h<sup>-1</sup>, 45% do obtido neste experimento (0,54g/L.h<sup>-1</sup>).

**Tabela 15:** Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura *S. cerevisiae* como inóculo.

Tempo (h)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Álcool (g/L)	Y <sub>P/S</sub> (gp/gs)	Q <sub>P</sub> (g/L.h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
0	34,83	18,23	0			
20	13,14	0	10,83	0,49	0,54	97,7

ART= Açúcares redutores totais, Y<sub>p/s</sub> = rendimento de produção em etanol; Q<sub>p</sub>= produtividade volumétrica e Ef= eficiência fermentativa.

O perfil do processo fermentativo conduzido com hidrolisado não destoxificado (MH50) está apresentado na Figura 29. Em relação ao processo fermentativo elaborado com MH50, a concentração inicial de AR, ART e glicose foram de 30,89g/L, 36,15g/L e 19,18g/L, respectivamente. A glicose foi praticamente toda consumida em um período de 24 horas. Nesse período a concentração de AR foi em torno de 12,00g/L e a concentração de ART foi de 12,85g/L, sugerindo assim, a preferência da levedura pela glicose.



**Figura 29:** Perfil de consumo de AR e glicose em (g/L) e produção de CO<sub>2</sub> (g) e etanol em meio constituído com 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura *S. cerevisiae* como inóculo.

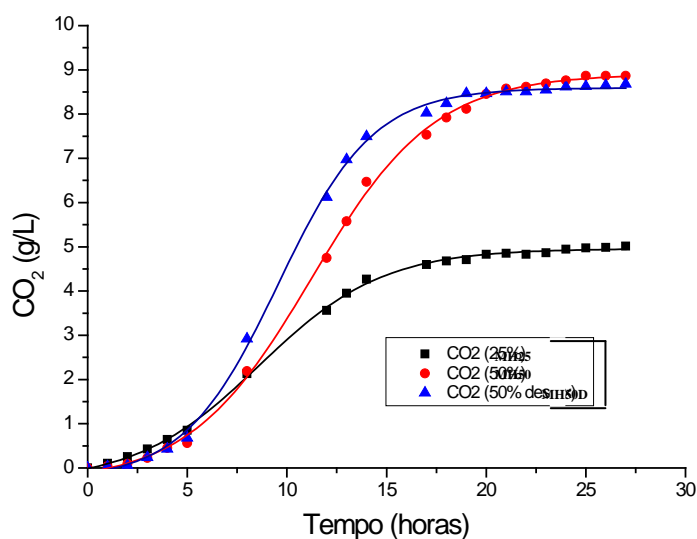
A quantidade de álcool produzida foi de 11,87g/L, gerando  $Y_{P/S}$  de 0,49;  $Q_P$  de 0,59g/L.h<sup>-1</sup> e  $E_f$  de 97,1%. Na Tabela 16 estão apresentadas as variáveis de respostas do processo fermentativo constituído por hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura *S. cerevisiae* como inóculo.

**Tabela 16:** Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura *S. cerevisiae* como inóculo.

Tempo (h)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Álcool (g/L)	$Y_{p/s}$ (gp/gs)	$Q_p$ (g/L.h <sup>-1</sup> )	$E_f$ (%)
0	36,15	19,18	0			
20	12,24	0	11,87	0,49	0,59	97,1

ART= Açúcares redutores totais,  $Y_{p/s}$  = rendimento de produção em etanol;  $Q_p$ = produtividade volumétrica e  $E_f$ = eficiência fermentativa.

Na Figura 30 estão representados os perfis da produção da massa de CO<sub>2</sub> (g) dos processos fermentativos conduzido com *S. cerevisiae* inoculados em três diferentes meios (MH25; MH50 e MH50D). Pode-se observar que no meio com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D), a cinética de produção de CO<sub>2</sub> foi maior do que no meio constituído por 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50). Isso significa que o consumo de açúcares também foi mais rápido. Observou-se ainda que a produtividade volumétrica do bioprocessamento (Q<sub>P</sub>), também foi maior com o meio destoxificado (Tabela 17). Tal fato pode estar atrelado à presença de inibidores no meio fermentativo (MH50) que dificultam o uso dos açúcares por parte da levedura (OLSOSN E HAGERDAL, 1996).



**Figura 30:** Perfis de produção de CO<sub>2</sub> (g) a partir de meio de fermentação constituído de 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% hidrolisado não destoxificado (MH50) e 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo.

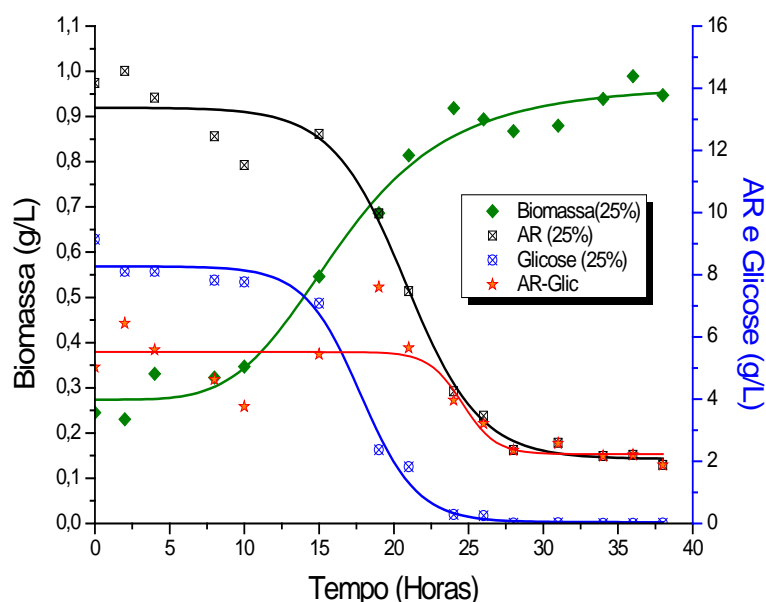
**Tabela 17:** Dados das produtividades dos meios de fermentação constituído de 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% hidrolisado não destoxificado (MH50) e 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) utilizando levedura *S. cerevisiae* como inóculo.

Variáveis	MH25	MH50	MH50D
CO <sub>2</sub> (g/L)	4,97	8,87	8,51
Q <sub>P</sub> (g/L.h <sup>-1</sup> )	0,20	0,35	0,41
Tempo (h)	25	25	21

Q<sub>P</sub>= produtividade volumétrica e CO<sub>2</sub>= Gás carbônico.  
 MH25=meio constituído com 25 % de hidrolisado; MH50= meio constituído com 50 % de hidrolisado e MH50D= meio constituído hidrolisado

### 3.2 FERMENTAÇÃO COM *Pichia stipitis*

No processo fermentativo elaborado com meio MH25, obteve-se no início do processo 14,17g/L de AR, 9,14g/L de glicose e 21,21g/L de ART, e no final 1,88g/L de AR e 3,56g/L de ART (os valores de ART não foram expressos na Figura 34 e sim AR). A glicose foi totalmente consumida no final da fase logarítmica (24 horas). Os dados obtidos e o perfil de consumo dos substratos apresentados na Figura 31 sugerem que a *P. stipitis*, assim como a levedura *S. cerevisiae* diante de uma fonte com variedade de carboidratos, tem preferência pela glicose. Considerando que o produto da hidrólise da hemicelulose é constituído além de hexoses por pentoses, após o esgotamento da glicose, outras hexoses e provavelmente pentoses foram consumidas durante o processo. Ferreira (2010) cita que a levedura *P. stipitis* produz etanol a partir de glicose, galactose, manose, xilose e celobiose, e que na presença de arabinose, esta apenas é assimilada e não fermentada. Ao final do processo fermentativo, obteve-se teor de 4,2g/L de etanol, com rendimento  $Y_{P/S}$  de 0,23, com produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) de  $0,17\text{g/L.h}^{-1}$  e com eficiência fermentativa de 46% (Tabela 18). O baixo rendimento em produto pode estar relacionado ao crescimento da biomassa durante o processo, no qual foi observado um rendimento de células em relação ao substrato ( $Y_{X/S}$ ) de 0,06.



**Figura 31:** Perfil de consumo de AR e glicose em (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25) utilizando levedura *Pichia stipitis* como inóculo.

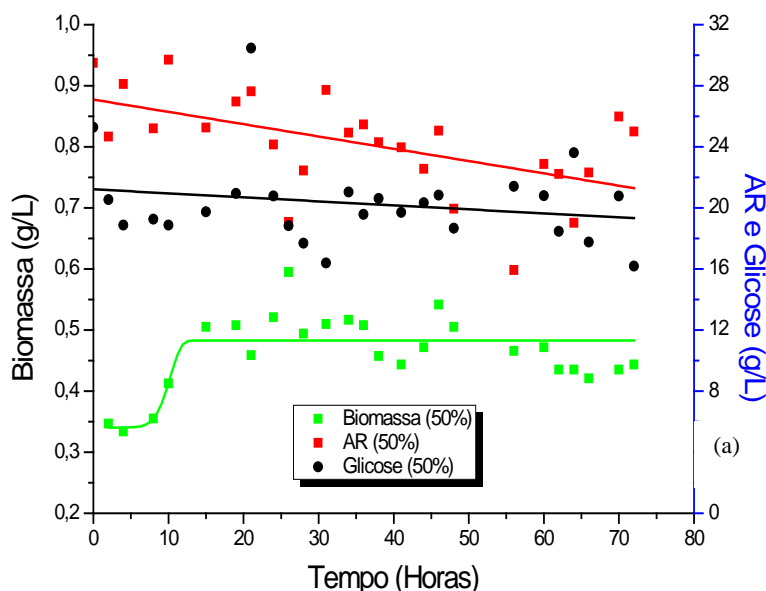
**Tabela 18:** Variáveis de respostas do processo fermentativo em meio constituído por 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25) utilizando levedura *Pichia stipitis* como inóculo.

Tempo (h)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Álcool (g/L)	Yp/s (gp/gs)	Qp (g/L.h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
0	21,21	9,14	0	0,23	0,17	46
25	3,5	0	4,2			

ART= Açúcares redutores totais, Yp/s = rendimento de produção em etanol; Qp= produtividade volumétrica e Ef= eficiência fermentativa.

Nos processos fermentativos com meios MH50 e MH50D conduzidos com a levedura *P. stipitis* (Figura 32 e 33), pode-se observar uma diferença expressiva no comportamento da *P. stipitis* relacionado ao crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol nos diferentes meios.

Em relação à biomassa, no meio MH50 pôde-se observar que não houve um crescimento de biomassa até 10 horas após o inóculo, enquanto que no meio MH50D, o crescimento de biomassa prosseguiu até aproximadamente 50 horas, gerando um rendimento de células em relação ao substrato ( $Y_{P/S}$ ) de 0,01 e 0,05, respectivamente.

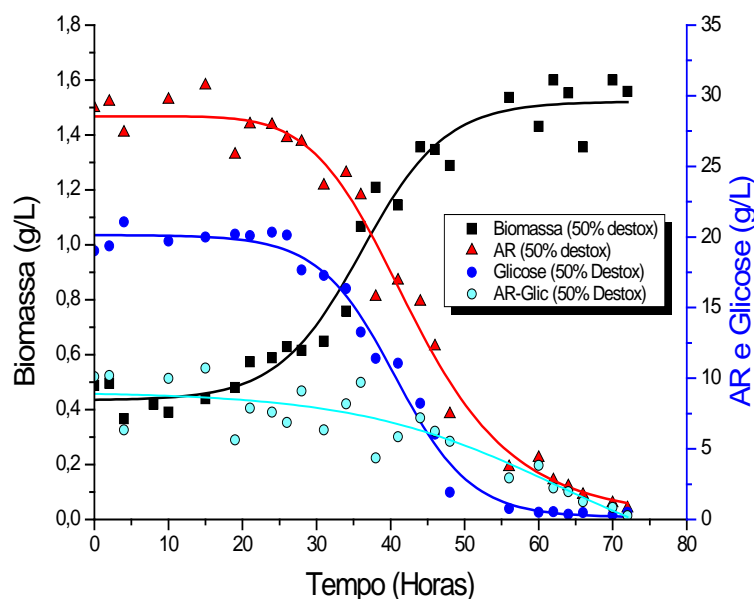


**Figura 32:** Perfil de consumo de AR e glicose em (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando levedura *Pichia stipitis* como inóculo.

Em relação aos açúcares, no meio MH50 não houve uma variação acentuada no consumo durante o processo de fermentação. A concentração inicial de AR, ART e glicose no meio foi de 29,49g/L, 31,75g/L e 20g/L, respectivamente. A concentração final, após 72 horas de fermentação foi de: 29,75g/L de ART; 25,00g/L de AR e 16g/L de glicose. Diferentemente do ocorrido no meio MH25, onde o consumo da fonte de glicose foi total em apenas 24 horas, os açúcares disponíveis no processo com meio MH50, apenas 21% destes foram consumidos. Este fato sugere que a presença de uma maior concentração de inibidores no hidrolisado afetou o desempenho metabólico da levedura, uma vez que o meio MH25 foi diluído 4 vezes. Ainda em relação aos meios de fermentação, a concentração de compostos fenólicos encontrada no meio MH50 foi de 382,3mg/L antes do tratamento para destoxificação e 118,3 mg/L, após o tratamento, representando um redução de 69% na concentração de compostos fenólicos no hidrolisado destoxificado com carvão ativado.

Cabe ressaltar, que na Figura 33, pode-se observar o perfil do consumo da concentração de AR subtraída de glicose. Este fato evidencia a presença de outras fontes de açúcares redutores além da glicose.

Avaliando o processo fermentativo utilizando meio não destoxificado (MH50) obtiveram-se como resultados às seguintes variáveis de resposta, (Tabela 19):  $Y_{P/S}$  de 0,009;  $Q_p$  de 0,00058g/L.h<sup>-1</sup> e  $E_f$  de 1,92%. Este último evidencia o quanto a presença de compostos tóxicos afeta o processo fermentativo por influenciar diretamente no metabolismo da levedura. Segundo PALMQVIST e HAGERDAL (2000), o rendimento de etanol e a produtividade são diminuídos na presença de compostos inibidores como: ácidos fracos, derivados de furanos e compostos fenólicos gerados durante a hidrólise da biomassa.



**Figura 33:** Perfil de consumo de AR e glicose em (g/L) e produção de biomassa (g/L) utilizando meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e a levedura *Pichia stipitis* como inóculo.

Avaliando o processo fermentativo utilizando meio destoxificado (MH50D) obtiveram-se como resultados às seguintes variáveis de resposta, (Tabela 19):  $Y_{P/S}$  de 0,28;  $Q_p$  de  $0,11\text{g/L.h}^{-1}$  e  $E_f$  de 54 %.

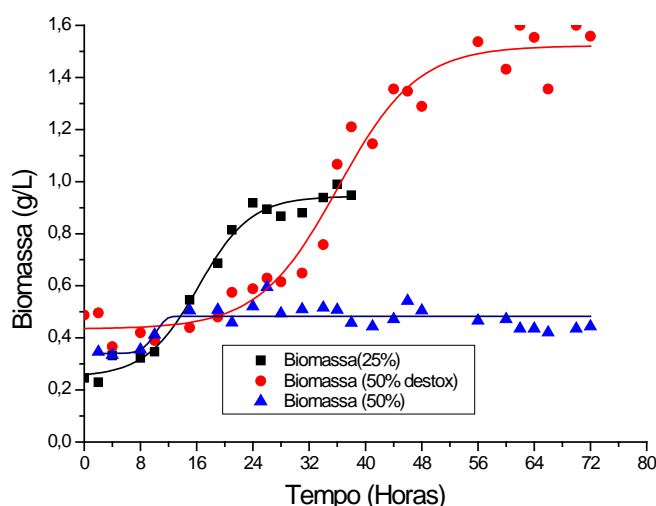
O uso do hidrolisado destoxificado para a fermentação com *P. stipitis* (Figura 33) permitiu o consumo total da glicose disponível e de outros açúcares, provavelmente pentoses, que não foram assimiladas e fermentadas quando se utilizou *S. cerevisiae*.

**Tabela 19:** Parâmetros dos processos fermentativos em meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando *Pichia stipitis* como inóculo

Meios	Tempo (h)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Álcool (g/L)	$Y_{p/s}$ (gp/gs)	$Q_p$ (g/L.h <sup>-1</sup> )	$E_f$ (%)
MH50	0	31,75	20	0	0,009	0,00058	1,92
	70	29,75	19	0,29			
MH50D	0	29,13	19,02	0	0,28	0,11	54
	70	1,88	0	8,29			

ART= Açúcares redutores totais,  $Y_{p/s}$  = rendimento de produção em etanol;  $Q_p$ = produtividade volumétrica e  $E_f$ = eficiência fermentativa.

Observando as curvas de crescimento dos três processos estudados, Figura 34, o melhor resultado foi observado no processo conduzido com o meio MH50D que apresentou taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de  $0,057 \text{ h}^{-1}$ , com tempo de duplicação de 12,2 h. De acordo HISS (2001) *apud* PANTOJA (2006) a taxa específica de crescimento está relacionada com o número de gerações que ocorrem por unidade de tempo, pois quanto maior a taxa ( $\mu$ ), mais rapidamente se divide a população, e maior será o número de gerações e menor o tempo de cada geração. Considerando que o  $\mu$  é um parâmetro que fornece a resposta do microrganismo frente às adversidades do meio, observou-se em relação ao crescimento específico das leveduras (Tabela 20) que para as condições de estudo realizadas com meio MH25 e MH50D não houve diferença expressiva. Todavia, em relação ao meio MH50 houve uma expressiva diferença, evidenciando, novamente, os efeitos tóxicos dos inibidores resultantes da hidrólise química.



**Figura 34:** Crescimento celular da levedura *P. stipitis* nas três condições estudadas: meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), meio constituído com 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50).

A Tabela 20 reúne os resultados das variáveis de respostas do para os três processos estudados (MH25, MH50 e MH50D) usando *S. cerevisiae* e *P. stipitis*. Foi possível observar maiores rendimentos de produção de etanol ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e eficiência fermentativa ( $E_f$ ), para todos os meios empregados, quando se trabalhou com *S. cerevisiae*. Em relação ao tempo de fermentação, o processo conduzido com *P. stipitis* levou 50 horas a mais para ser concluído, nas mesmas condições empregadas para o processo inoculado com *S. cerevisiae*.

**Tabela 20.** Dados gerais das variáveis de respostas dos processos fermentativos empregando meios constituídos com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae*, como inóculo

Meios/inóculo	<i>P. stipitis</i>					<i>S. cerevisiae</i>				
	Tempo (h)	Álcool (g/L)	Yp/s (gp/gs)	Qp (g/L.h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Tempo (h)	Álcool (g/L)	Yp/s (gp/gs)	Qp (g/L.h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
MH50	0	0				0	0			
	70	0,29	0,009	0,00058	1,9	20	11,87	0,49	0,59	97,1
MH50D	0	0				0	0			
	70	8,29	0,28	0,11	54	20	10,83	0,49	0,54	97,7
MH25	0	0				0	0			
	25	4,2	0,23	0,17	46	20	5,38	0,42	0,27	82,2

Yp/s = rendimento de produção em etanol; Qp= produtividade volumétrica e Ef= eficiência fermentativa.

Quanto ao rendimento em células em relação ao substrato (Tabela 21), o rendimento obtido ( $Y_{x/s}$ ) foi de 0,085 no processo empregando MH25. Este valor foi superior aos encontrado nos demais meios e foi superior em 50% ao comparado com os dados obtidos por HAGERDAL et al. (1994), 0,04, empregando meio sintético com 20 % de glicose como fonte de carbono.

**Tabela 21:** Parâmetros de crescimento celular dos processos fermentativos em meio constituído com 25% de hidrolisado não destoxificado (MH25), 50% de hidrolisado destoxificado (MH50D) e 50% de hidrolisado não destoxificado (MH50) utilizando *Pichia stipitis* como inóculo

Meio	$Y_{x/s}$ (gx/gs)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\Delta t$ (h)	Tempo de duplicação (h)
MH25	0,085	0,078	11	8,9
MH50	0,037	0,050	07	13,7
MH50D	0,054	0,057	13	12,2

$Y_{x/s}$  = rendimento de células em relação ao substrato;  $\mu$  = taxa específica de crescimento celular;  $\Delta t$  = intervalo de tempo da fase log em horas.

## PARTE V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 1 CONCLUSÕES

A torta de macaúba apresentou cerca de cinquenta por cento de carboidratos passíveis de uso para produção de bioetanol.

O uso de planejamento DCCR permitiu o desenvolvimento de processo de sacarificação da torta de macaúba com eficiência de 92%.

A levedura *Pichia stipitis* se mostrou mais sensível à presença de inibidores presentes no hidrolisado quando comparada com *Saccharomyces cerevisiae*.

O tratamento de destoxificação com carvão ativado se mostrou eficaz para o hidrolisado de torta de macaúba, uma vez que a redução de compostos fenólicos possibilitou o crescimento da levedura *Pichia stipitis* e a fermentação dos açúcares ali presentes.

A levedura *Pichia stipitis*, embora com menor valor de  $Y_{P/S}$ , foi capaz de utilizar a glicose e outros açúcares redutores não utilizados pela *S. cerevisiae*.

A torta de macaúba se mostrou uma potencial biomassa para produção de bioetanol se considerada um resíduo da indústria de óleo, uma vez que utilizando a levedura *Pichia stipitis* em meio MH50D foi possível obter cerca de 70 litros de etanol anidro/tonelada de torta de macaúba e utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* será possível obter cerca de 104L de etanol por tonelada de torta de macaúba.

### 2 SUGESTÕES OU PERSPECTIVAS

O processo de sacarificação enzimática mostrou-se tecnicamente viável. Ainda assim há possibilidade de aumento da eficiência hidrolítica através da otimização da sacarificação da fração celulósica. Isto poderá ser realizado combinando-se processos de pré-tratamento e enzimas comerciais ou experimentais mais eficientes.

A fração de hemicelulose, constituída principalmente por pentoses, representa 9% da torta de macaúba, ou cerca de 20% da fração de carboidratos. A fermentação dessas pentoses poderá incrementar em cerca de 20L a produção de etanol por tonelada de torta. Diante disso valerá um estudo de otimização da fermentação com *P. stipitis*.

Para obtenção de fermentados com concentrações de etanol que permitam a destilação direta do mosto dever-se-á abordar processos com relação sólido-líquido maiores do que as experimentadas nesta dissertação.

O modelo usado para avaliação da torta de macaúba poderá ser usado para outras biomassas, gerando-se informações importantes sobre a possibilidade de obtenção de álcool combustível de biomassas residuais ou com baixo valor comercial.

## PARTE VII 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 **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial. p.260-258, 2008

ABREU, Heber Santos: **Biossíntese de lignificação**. Itaguaí: EDUR, 1994. 63 p.

AGBOGBO, K. F., KELLY, G. C., SMITH, F. T. M., WENGER, S. K. Short communication: Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis* **Process Biochemistry** 41. 2333–2336. 2006

ARANTES E SADDLER: Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis **Biotechnology for Biofuels** 3:4. 2010

ARAÚJO, C. N. L., MAIA, G. A., NUNES, R. P., GUEDES, Z. B. L., MONTEIRO, J. C. S. Caracterização do óleo das sementes de doze genótipos de girassol (*Helianthus Annuus*, L.) obtidos sob condições climáticas no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.29, n.6, p.901-906. 1994.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 900.02). Arlington A.O.A.C., cap 44. p. 3. 1996

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

BOUDET, A., KAJITA, M., PETTENATI, G. J., GOLFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **TRENDS in Plant Science** Vol.8 No.12 December 2003

BRASIL. Ministério das Minas e energia- MME. Decreto-lei n. 76.593, de 14 de novembro de 1975, Dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética e a Agência Nacional do Petróleo e dá outras providências. <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/decreto/1975/dec%2076.593%20-201975.xml>. Acesso em: 18 de junho de 2011.

BRASIL. Casa Civil. Lei n. 11097 de 13 de janeiro de 2005, Dispõe sobre a introdução do

biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n<sup>os</sup> 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Disponível: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9847.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9847.htm), <http://www.receita.fazenda.gov.br/legislação/leis/2002/lei10636.htm>. Acesso em: 22 de junho de 2010

BERNFELD P. **Enzymes of starch degradation and synthesis**. Advances in enzymology, v. 12, 379-481p, 1951

CANILHA L, et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica** n<sup>o</sup>44, 2010

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 3. 593 p. 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Relatório do Levantamento de abril**  
Disponível em:  
<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_04\\_07\\_18\\_40\\_56\\_girassolmarco\\_2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_04_07_18_40_56_girassolmarco_2011.pdf)> p 1-5, 2011. Acesso em: 04 de junho de 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Relatório do Levantamento de maio**  
Disponível em:  
<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_02\\_09\\_17\\_04\\_07\\_boletim\\_fevreiro-11.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_02_09_17_04_07_boletim_fevreiro-11.pdf)> p 1-44, 2011. Acesso em: 04 de junho de 2011.

DEMIRBAS, M.F. – Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review-**Energy Conversion and Management**. n<sup>o</sup> 50 p.2782-2801. 2009

DEMIRBAS, M.F. – Biowastes to biofuels. **Energy Conversion and Management**, n<sup>o</sup>.52 p. 1815–1828, 2011

FARIAS, T.M. **Contribuições para o processamento dos frutos da palmeira macaúba (*Acrocomia ssp*)**. Minas Gerais. UFMG,2010.104p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Escola de Engenharia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

FERRARI, R.A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Vol.28. n<sup>o</sup>1,19-23, 2005

FERREIRA, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. São Paulo, Lorena

USP, 2010. 119p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e bioenergia - Química. Nova, Vol. 32, No. 3, 582-587, 2009

HAGERDAL, H., JEPSSON, H., SKOOG, K., PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast **Enzyme Microb. Technology**, v.16. 1994

HODGE, D.B., ANDERSSON, C., BERGLUND, K. A., ROVA, U. **Enzyme and Microbial Technology** n°44 309–316. 2009

HIANE P.A, Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. Caracterização e composição em ácido graxos **Braz. J. Food Technol.**, v.8, n.3, p. 256-259. 2005

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

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.

INOUE, H., YANO, S., ENDO, T., SAKAKI, T., SAWAYAMA, S..Combinig hot compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis of eucalyptus. **Biotechnology for Biofuels** n°1.2. 2008.

JUHÁ T., S, ZENGYEL Z, RECZEY K, SIIKA-AHO M, VIKARI L, Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources **Process Biochemistry** n°40 ,3519–3525.2004

KAMER, S. B. V., GINKEL, V. L. **Cer.Chem.,Sanit Paul**,v19,n°4,p239-251,1952

KIM S, DALE, B.E., Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass Bioenergy**, v.26, 361-375p. 2004

LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**, 4ed Editora Sarvier, 2005.930p

MACEDO, A. L., SANTOS, R. S., PANTOJA, L.,SANTOS, A. S., Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v 28, n°01, pp 9-15, 2011

MEINANDER,N.Q. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without over expression of TAL1. **Biosource technology**.n°68.79-87. 1999

McCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V., OWENS, H. S. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. **Analytical chemistry**. v. 22(9), p. 1156-1158. 1950.

MELO,W.C., Anna L.,M.M.S, Santos,A.S. – Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos **Quimica. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1104-1106, 2008

MONTGOMERY D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**,4°ed.,Editora LTC, 2004.517p

NICHOLS, N.N., DIEN, M COTTA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors **Bioresource Technology** 101 7545–7550. 2010

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação de aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierárquico da toxicidade dos inibidores celulares**. Rio de Janeiro:UFRJ, 2010. 130p Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010

OLOFSSON, K., BERTILSSON, M. LÍDEN G. A short review on SSF – an interesting process for ethanol production from lignocellulosic feedstock. **Biotechnology for Biofuels**. n°1.7.2008

OLSSON, L.; HAGERDAL, H. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**. n°18, 312-331.1996.

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

PARENTE, E. J. S. Uma aventura tecnológica num país engraçado. Disponível em : <<http://www.iadb.org/intal/intalcdi/PE/2008/01430.pdf>>1°ed, 2003.66p. Acesso em 21 de junho de 2011.

RIBEIRO, E.P. **Química de Alimentos**. Ed Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 1°ed. 2004.

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

RUTZ,D, JANSSEN, R. **Biofuel technology Handbook**. 2°ed 2008.149p

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagents. *Meth Enzymology*, 299.152-78.1999

SOUTHGATE, D. A. T. **Determination of food carbohydrates**. London.. Ed. Applied Science Publishers LTD .1991, 177p

TANIGUSHI M., TOHMA T., ITAYA T., FUJI M., Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory-Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae* **Journal of Fermentation and Bioengineering** Vol. 83, No. 4, 364-370. 1997

TRINDADE, W. G., HOAREAU, W., RAZERA, I. A. T., RUGGIERO, R., FROLLINI, E., CASTELLAN, A. PhenolicsThermoset Matrix Reinforced with Sugar cane bagasse: attempt to develop a new fiber surface chemical modification involving formation of quinones followed by reaction with furfural alcohol. **Macromol.Mater Eng.**289.728-736.2004

VELOSO, D. P. Isolamento e análise estrutural de lignina. **Química Nova**, 16, (5), 2003

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.**, v 26, n.5, p.829-835. 1970