



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS**



TESE DE DOUTORADO

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU
(*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*)**

ORIENTANDA: ALEKSANDRA SILVA ROCHA

ORIENTADOR: DR. FLÁVIO LUIZ HONORATO DA SILVA

Campina Grande-PB

Dezembro/2012

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*)

Aleksandra Silva Rocha

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Curso de Doutorado em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande—UFCG, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Processos.

Área de concentração: Processos Químicos

Orientador: Prof.: Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Campina Grande, PB.

Dezembro de 2012.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

R672p

Rocha, Aleksandra Silva.

Processo de obtenção de etanol por hidrólise enzimática do bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale L.*) / Aleksandra Silva Rocha. -- 2012.

66 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2012.

"Orientação: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva."

Referências.

1. Hidrólise Enzimática. 2. Biomassa. 3. Bioetanol. 4. Pedúnculo de Caju.
I. Silva, Flávio Luiz Honorato da. II. Título.

CDU 66.094.941(043)

DEDICATÓRIA

ÀDEUS

Pela oportunidade de mais uma conquista.

Aos meus pais,

MARIO ROCHA(*in memorian*) **E MARINÊS SILVA**

Por serem meus exemplos e sempre estarem ao meu lado.

Ao grande amor da minha vida,

EDVAN

Por acreditar em mim, me apoiar e fazer cada
dia um dia mais feliz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, toda minha admiração e carinho e, acima de tudo, respeito por ser excelente profissional e pessoa humana que é, pois, sem sua valiosa paciência e generosidade, eu não teria chegado até aqui.

À Dr. Líbia de Sousa Conrado Oliveira meus agradecimentos por toda sua ajuda profissional, disponibilidade e principalmente pela enorme força psicológica que me deu.

À doutoranda Flávia Cristina, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa, o meu muito obrigado sempre ao meu lado nos momentos de alegria e difíceis também.

Ao Dr. Ezenildo, pela grande ajuda durante esta caminhada.

Ao Dr. Marcelo Muniz, meu amigo, um porto seguro no qual pude tê-lo todo tempo ao meu lado; muito bom ter você em minha vida; obrigado por tudo.

Agradeço imensamente a João Paulo, sempre presente, participando de forma ativa deste estudo.

Agradeço carinhosamente a Paloma, pela disponibilidade e amizade.

Aos colegas de laboratórios de transferência de calor e massa em meios porosos Neto, Daniel, Vitória, Ângela e Siumara Alcântara.

Aos funcionários dos laboratórios de transferência de calor e massa e Engenharia Bioquímica, Seu Lopes e Seu Jardes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, pela oportunidade em desenvolver o projeto.

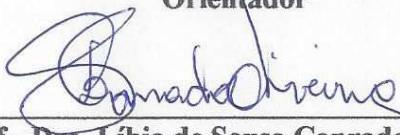
À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

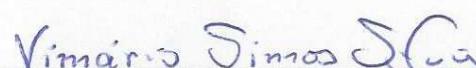
Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

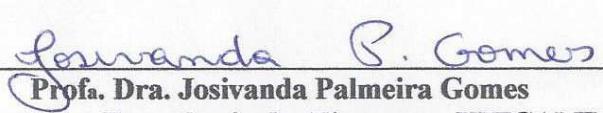
**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU
(*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*)**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, Presidente
Doutor em Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador


Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Doutora em Engenharia Química – UNICAMP
Examinadora Interna


Prof. Dr. Vimário Simões Silva
Doutor em Engenharia de Processos – UFCG
Examinador Interno


Prof. Dra. Josivanda Palmeira Gomes
Doutor em Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Examinadora Interna


Prof. Dr. Manoel Ferreira Alves
Doutor em Engenharia Química- UFCG
Examinador Externo


Dr. Marcelo Barbosa Muniz
Doutor em Engenharia de Processos – UFPB
Examinador Externo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo geral.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1 O caju.....	5
2.1.1 Pedúnculo do caju.....	6
2.1.2 Biomassa.....	7
2.1.2.1 Principais fontes da biomassa.....	8
2.1.3 Celulose.....	9
2.1.4 Hemicelulose.....	10
2.1.5 Lignina.....	11
2.2 Pré-tratamento.....	12
2.3 Hidrólise ácida.....	13
2.4 Hidrólise enzimática.....	14
2.5 Fermentação.....	18
2.6 Etanol.....	18
2.7 Estado da arte	19

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Local da pesquisa.....	24
3.2 Matéria prima.....	24
3.3 Caracterização do bagaço do pedúnculo de caju e bagaço de cana.....	25
3.3.1.1 Determinação de pH.....	26
3.3.1.2 Determinação de umidade.....	26
3.3.1.3 Teores de celulose.....	26
3.3.1.4 Teores de lignina.....	27
3.3.1.5 Teor de sólidos solúveis (°Brix).....	27
3.3.1.6 Análise do teor de extractivos	27
3.4 Hidrólise enzimática.....	28
3.4.1 Primeira etapa: planejamento experimental 2^3 da hidrólise enzimática do ba- gaço do caju pré-tratado com ácidos e hidróxido de sódio.....	29
3.4.1.1 Pré-tratamento ácido.....	30
3.4.1.2 Enzima usada e determinada da atividade enzimática.....	31
3.4.1.3 Ensaios da hidrólise enzimática.....	33
3.4.2 Segunda etapa: hidrólise do bagaço do caju produzido pelo melhor pré-trata- mento.....	33
3.4.3 Terceira etapa: hidrólise do bagaço de cana de açúcar	34
3.5 Quantificação dos açúcares da hidrólise.....	34
3.6 Fermentação alcoólica do licor sacarificado do bagaço do caju.....	34
3.6.1 Preparação do inóculo.....	34
3.6.2. Inoculação do microrganismo no licor hidrolisado.....	35
3.7 Rendimento em etanol.....	35
3.8 Produtividade total em etanol.....	36
3.9 Eficiência do processo fermentativo.....	36

CAPÍTULO IV

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju e da cana	38
4.2 Hidrólise enzimática.....	40
4.2.1 Planejamento experimental 2^3 da hidrólise enzimática do bagaço do caju.....	40
4.3 Aumento da adição da atividade enzimática da celulase.....	45
4.4 Cinética da fermentação.....	46
4.4.1 Estudo da cinética da fermentação.....	46

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES 53

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	54
---	----

CAPÍTULO VI

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55

APÊNDICE A.....	63
APÊNDICE B	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Caju in natura.....	6
Figura 2.2 - Estrutura da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.....	11
Figura 2.3 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.....	12
Figura 2.4 - Esquema estrutural proposta para a lignina de <i>Eucalyptusgrandis</i> (madeira-dura).....	13
Figura 2.5 - Modo de ação das celulases e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose (modelo de sinergismo endo-exo).....	16
Figura 2.6 - Representação esquemática da hidrolise da celulose. C: regiões cristalinas, R: grupos terminais redutores, NR: grupos terminais não-redutores, CBH I e II: exoglucanases, EG: endoglucanases.....	17
Figura 3.1 - Fluxograma apresentando cada uma das etapas do processamento do bagaço seco do pedúnculo do caju e da cana-de-açúcar.....	27
Figura 3.2 - Reator utilizado nos experimentos para as hidrólises ácidas.....	33
Figura 3.3 - Fluxograma apresentando cada uma das etapas do processamento para obtenção do etanol.....	39
Figura 4.1 - Diagrama de Pareto para a hidrólise enzimática do bagaço de caju ácido sul-Fúrico (48 h).....	43

Figura 4.2 - Superfície de resposta das influências das variáveis de entrada temperatura e atividade de celulase adicionada ao meio,tendo a concentração do ácido mantida constante no nível -1 para a resposta concentração de glicose no licor hidrolisado no tempo de 48 h utilizando-se de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio no pré-tratamento.....	44
Figura 4.3 - Perfil cinético do consumo da glicose para produção do etanol nos pontos centrais na T= 30°C pH= 4,8 concentração do NH ₄ SO ₄ =0,6g/L, KHPO ₄ =0,12g/L, concentração de levedura 10g/L.....	50
Figura 4.4 - Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento na fermentação da hidrólise enzimática do bagaço de caju.....	52
Figura 4.5 - Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre o% de conversão na fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço do caju.....	53
Figura 4.6- Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a produtividade na fermentação da hidrólise enzimática do bagaço de caju.....	53
Figura 4.7 - Superfície de resposta das influências das variáveis concentração de levedura e fonte de nitrogênio, fixando a fonte de fósforo no nível +1 para a resposta produtividade da fermentação alcoólica do licor da hidrólise enzimática.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Valores codificados e reais das variáveis de entrada.....	31
Tabela 3.2	Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 para o hidrolisado pré-tratado com ácido sulfúrico e ácido fosfórico.....	32
Tabela 4.1	Caracterizações químicas do bagaço do caju e cana.....	40
Tabela 4.2	Matriz de planejamento com a resposta concentração de glicose liberada Após a hidrólise enzimática no licor hidrolizado do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico no tempo de 48 h.....	42
Tabela 4.3	Análise de variância da resposta concentração de glicose (48 h e ácido sulfúrico).....	44
Tabela 4.4	Concentração de glicose dos processos de hidrólises.....	48
Tabela 4.5	Valores dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica do licor hidrolisado enzimaticamente.....	51
Tabela 4.6	A NOVA para a resposta produtividade.....	54
Tabela 3.4	Matriz de planejamento DCCR para o estudo do processo de destoxificação.	58
Tabela 4.1	Caracterização físico-química do bagaço do caju seco a 55 °C.....	61
Tabela 4.2	Caracterização físico-química do bagaço após o pré-tratamento ácido.....	64
Tabela I	Quantidade de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço do caju pré-tratado com ácido sulfúrico e ácido fosfórico por 48 e 72 h de hidrólise enzimática.....	71

RESUMO

Os resíduos agroindustriais são abundantes e passíveis de ser aproveitados como substratos em processos biotecnológicos para obtenção de produtos de alto valor agregado. No Brasil existem diversos resíduos, tais como o bagaço do pedúnculo de caju e da cana de açúcar; no entanto, para que ocorra a bioconversão desses materiais, é necessário um tratamento de hidrólise ácida ou enzimática. O processo de hidrólise enzimática requer o desenvolvimento de micro-organismos capazes de quebrar a celulose, fermentar o açúcar e produzir o etanol. O presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de conversão da celulose em açúcares fermentescíveis (glicose) utilizando como fonte de biomassa o bagaço do pedúnculo de caju e o bagaço cana-de-açúcar, comparando suas eficiências no processo. Um Planejamento fatorial 2^3 foi realizado para avaliar a concentração de H_2SO_4 ou H_3PO_4 , tempo de pré-tratamento e atividade de celulase em FPU. Os melhores valores que influenciaram a concentração de glicose no licor da hidrólise enzimática, eram direcionados aos tratamentos, utilizando-se 7 FPU de celulase, em 24 horas para o bagaço do pedúnculo de caju e 48 horas para o bagaço da cana-de-açúcar. Pôde-se concluir, também, que para obter uma eficiência de 90% da fermentação alcoólica tendo como função objetiva o máximo de % de conversão do açúcar em etanol, deve-se operar o processo fermentativo nos níveis de concentração de levedura no ponto central (10 g/L), fonte de nitrogênio (0,6 g/L) e fonte de fósforo (0,12 g/L). Para a produtividade observaram efeitos significativos das variáveis e se verificou que o modelo é estatisticamente significativo, constatando-se, então um valor máximo em torno de 2 g/L h.

Palavras-chave: hidrólise enzimática, biomassa, bioetanol

ABSTRACT

The agro-industrial residues are abundant and can be availed as substrates for biotechnological processes for production of high added value. In Brazil there are many residues, such as bagasse from cashew apple and sugar cane, however, that the bioconversion takes place these materials requires a treatment of acidic or enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis process requires the development of micro-organisms capable of breaking the cellulose ferment sugar and produce ethanol. This study aimed to explore the process of conversion of cellulose into fermentable sugars (glucose) using as source of biomass bagasse from cashew apple bagasse and cane sugar comparing their efficiency in the process. factorial designs 2^3 were performed to evaluate the concentration of H_2SO_4 or H_3PO_4 , time of pre-treatment and cellulase activity in (FPU). The best values that influenced the concentration of glucose in the enzymatic hydrolysis liquor were for treatments using 7 FPU of cellulase in 24 hours for the cashew apple pomace and 48 hours for the bagasse from sugar cane. Where it could be concluded that also for a 90% efficiency of alcoholic fermentation, and the objective function with the maximum% conversion of sugar to ethanol, one should operate the fermentation in yeast concentration levels at the midpoint (10g / L), nitrogen source (0.6 g / L) and phosphorus source (0.12g / L). For productivity was observed significant effects of variables and found that the model is statistically significant where the maximum value was observed at around 2 g / L h.

Key words: enzymatic hydrolysis, biomass, ethanol

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Com base na mobilização mundial acerca do aquecimento global e das mudanças climáticas que o planeta vem sofrendo, fontes renováveis e limpas de energia estão sendo utilizadas na tentativa de mitigação dos problemas (Almeida, 2009). Como a biomassa é um recurso renovável que pode atingir emissões de carbono baixas ou quase nulas (desde que tecnologias apropriadas de conversão sejam usadas e as matérias-primas utilizadas sejam geridas de forma sustentável), considera-se que uma dependência maior da biomassa em aplicações modernas pode desempenhar papel importante na transição para sistemas energéticos mais sustentáveis. A biomassa merece atenção especial visto que, no curto ou médio prazo, oferece as alternativas mais promissoras aos combustíveis líquidos à base de petróleo para o setor de transporte(Borba & Gaspar, 2010).

De acordo com Zheng et al. (2009) a hidrólise de biomassa lignocelulósica tem recebido considerável atenção devido à sua disponibilidade em nível mundial e imenso potencial para transformação em açúcares e combustíveis alternativos, como o etanol. As vantagens do uso do etanol como combustível na sua forma hidratada como substituto para a gasolina ou misturado com gasolina como álcool anidro, são numerosas, com a redução das emissões nocivas e gases do efeito estufa.

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química. Como vantagens, especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (Mannheim & Cheryan, 1992; Pearce, 1995; Clemente, 2000) e, atualmente, as desvantagens são os elevados custos do complexo enzimático e a necessidade de pré-tratamento para conseguir conversões eficientes(CGEE, 2005).

Dentre as frutas cultivadas no Nordeste o caju merece destaque tendo em vista sua importância socioeconômica para o país.Segundo o SESI (2007) estima-se que cerca de 80% da polpa, ou seja, do pedúnculo do caju sejam desperdiçados. Portanto, chega-se a um montante de 1,9 milhão de toneladas não aproveitadas, deste alimento rico em teor nutritivo (Gomes,2010).

Neste cenário o Brasil se mantém em posição privilegiada para assumir potencial de cultivo de matérias-primas renováveis, dispondo de: i) Culturas agrícolas de grande extensão, com destaque para a indústria canavieira; ii) Maior biodiversidade do planeta; iii) Intensa radiação solar; iv) Água em abundância; v) Diversidade de clima; vi) Pioneirismo na produção do bicompostível etanol e vii) Grande recurso renovável, com excepcionais potencialidades: as microalgas para a produção de biodiesel, produtos químicos, fármacos e alimentos. O país reúne, ainda, condições para ser o principal receptor de investimentos no segmento de produção e uso de bioenergia e por ter, no meio ambiente, sua maior riqueza (CGEE, 2010).

Com relação à tecnologia da produção de etanol utilizando-se da matéria-prima cana-de-açúcar, o país é, neste setor, líder mundial na produção de etanol e açúcar com 27,7 bilhões de litros e 31,3 milhões de toneladas, respectivamente, na safra de 2008/2009 (Cortez, 2010).

Assim, o etanol desperta a atenção de pesquisadores, empresas e governo em decorrência das pressões e perspectivas de esgotamento das fontes não-renováveis de combustíveis fósseis e, sobre maneira, das preocupações de natureza ambiental relacionadas à emissão de substâncias que comprometem o meio ambiente.

A biotransformação desses resíduos por processos enzimáticos para a produção do álcool etílico hidratado passa, necessariamente, por minucioso estudo científico e tecnológico, na busca dos parâmetros cinéticos de ajustes e controle das reações envolvidas. Sendo assim, diversos substratos têm sido utilizados como meio para a obtenção do etanol como: bagaço de cana (Rueda et al., 2010) fécula de mandioca (Leonel & Cereda, 1999), banana (Silva, 2009) e farinha do mesocarpo do babaçu (Pavlak et al., 2007) entre outros.

1.1. JUSTIFICATIVA

Desde o século passado os combustíveis derivados do petróleo têm sido a principal fonte de energia mundial. No entanto, previsões de que este recurso deva chegar ao fim somadas às crescentes preocupações com o ambiente, têm instigado a busca de fontes de energia renovável (Ghassan et al., 2003).

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol e o álcool produzido a partir de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis (ANP, 2010).

Tendo em vista a constante busca de novos materiais do tipo biomassa para a produção de álcool celulose, o pedúnculo do fruto do caju se apresenta como alternativa, destacando-se o Estado do Ceará como o principal produtor e cuja safra foi, no período de 2008, de 121.045 mil toneladas de caju numa área plantada de 397.4 mil hectares (ANUALPEC, 2009).

No contexto mundial os biocombustíveis deverão suprir uma importante parte da demanda por energia devido sobre tudo a questões de ordem ambiental, pela elevação dos preços do petróleo e pela incerteza na oferta de combustíveis fósseis no médio e longo prazos. Biocombustíveis são fontes de energias renováveis derivados de produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, oleaginosas, biomassa e outras fontes de matéria orgânica. No Nordeste brasileiro o volume de etanol produzido não representa uma quantidade importante comparada à produção nacional. Assim, a otimização de processos alternativos baratos é imperativa. A agroindústria do caju produz, anualmente, 2 milhões de toneladas de pedúnculos (Oliveira & Andrade, 2007). A área ocupada com cajueiro no Brasil é estimada em 700.000 ha dos quais mais de 90% se encontram na região Nordeste sendo que 80% estão distribuídos nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Paraíba. Os produtos industriais são consumidos, basicamente, pelo mercado local e não desempenham papel relevante na economia brasileira. Além disto, grande parte do caju é perdida na colheita acumulando-se no solo com aproveitamento industrial de apenas 15% do total (Morton & Dowling; 1987; Campos et al., 2002; Assunção & Mercadante, 2003; Azevedo & Rodrigues, 2000).

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande - LEB/CCT/UFCG, utilizando-se material lignocelulósico bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) e cladódio da raquete da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill), por via ácida e enzimática, com posterior fermentação dos licores hidrolisados para produção de etanol.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Estudar a hidrólise enzimática da matéria-prima lignocelulósica do bagaço do caju (*Anacardium Occidentale* L.) e a produção de bioetanol a partir do licor hidrolisado.

1.2.2. Objetivos específicos

-Caracterização físico-química da matéria-prima do bagaço do pedúnculo do caju e da cana-de-açúcar (pH, umidade, celulose, lignina, °Brix – sólidos solúveis totais, ART - açúcares redutores totais e extrativos);

- Acompanhar a cinética da hidrólise enzimática da matéria lignocelulósica (bagaço de caju), através da metodologia do planejamento experimental 2^3 para verificar a influência do pré-tratamento ácido (concentração do ácido, tempo de pré-tratamento) e da atividade de celulase sobre a hidrólise enzimática do bagaço do pedúnculo do caju pretratado;

- Caracterização química e físico-química do hidrolisado (licor) enzimático;
- Determinar os parâmetros cinéticos na fermentação alcoólica do meio hidrolisado (Rendimento teórico ($Y_{P/S}$), produtividade (Q_p) e eficiência do processo fermentativo (E_f).

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Caju

O cajueiro (*Anacardium Occidentale* L.), Figura 2.1, é considerado uma das frutíferas mais importantes e de ampla distribuição nos trópicos; sua origem é bastante discutida mas as provas indicam, de forma convincente, ser o Brasil, ou todo o Norte da América do Sul e parte da América Central, os centros de procedência dessa espécie cujo fruto se divide em um pseudofruto (pedúnculo) e a castanha (o fruto).



Figura 2.1.Caju in natura

Além das qualidades nutritivas e medicinais da castanha do caju, o sabor exótico tornou-a popular ao longo dos anos; hoje, é largamente apreciada em todos os países para acompanhamento de drinks ou na composição de aperitivos sofisticados.

Há uma diversidade de produtos gerados a partir do caju; entretanto, é a amêndoia de castanha de caju que apresenta maior expressão econômica destinando-se principalmente ao mercado externo. Os demais produtos estão voltados basicamente ao atendimento da demanda interna (EMBRAPA, 2007).

A produção desta oleaginosa se concentra na região Nordeste do País, sendo o Estado do Ceará o principal produtor nacional respondendo, no ano de 2008, por 49,8% da produção de castanha de caju. Esta participação é ainda maior em anos sem registro de estiagem, como em 2002 e em 2006, em que o Ceará foi responsável por 62,3% e 53,6%

da produção interna, respectivamente (IBGE, 2010). Em 2009 a exportação cearense de amêndoas de castanha de caju totalizou US\$ 187,0 milhões, correspondendo a 80,7% do valor total exportado pelo Brasil (MDIC, 2010).

A importância da agroindústria para os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, é representada pela movimentação de 147,2 milhões de dólares em exportações de amêndoas, milhares de empregos, diretos e indiretos, em todas as atividades dos segmentos de produção e industrialização da cadeia agroindustrial (Paiva et al., 2011).

O verdadeiro fruto do cajueiro é a castanha da qual é extraída a amêndoas com 2,5 a 3,0 cm de comprimento, 2,5 cm de largura e coloração marron-acinzentado. Após o desenvolvimento da amêndoas o pedúnculo alongado intumesce para formar um pseudofruto chamado “maçã de caju”, de formato piriforme e romboide com 5-10 cm de comprimento, 4-8 cm de largura; possui uma casca fina e cerosa de cor vermelho-amarelo ou vermelho e amarelo. A polpa é amarelo pálido, macia, fibrosa, suculenta, adstringente e ácida a subácida, apresentando aroma característico (Chitarra & Chitarra, 2005).

2.1.1.Pedúnculo do caju

Para Moura et al. (2001) o mercado consumidor para pedúnculo in natura é crescente e exigente em frutos que apresentem alta resistência ao manuseio, formato piriforme e frutos de coloração laranja e vermelha podendo, ainda, ser aproveitados na forma de subprodutos variados como sucos, sorvetes, doces, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados e aguardentes; suas características físicas são de fundamental importância para definição de técnicas de manuseio pós-colheita, tal como de boa aceitação do produto pelo consumidor.

A qualidade do pedúnculo para consumo in natura está relacionada a uma boa firmeza, doçura, baixa adstringência e acidez. Além disto, o consumidor prefere pedúnculos de cor laranja a vermelha e de tamanho grande, ou seja, dos tipos 4 ou 5(de acordo com o número de cajus/bandeja). Esses tipos alcançam os melhores preços no mercado (Alves, 1998; Moura et al., 2001).

O pedúnculo do caju é bastante perecível quando armazenado em temperatura ambiente. Após o período de 48h apresenta-se enrugado, fermentado e, consequentemente, perde sua atratividade. O curto período de armazenamento é de

fundamental importância visto que dificulta ou até impossibilita o produtor de enviar seus frutos a centros consumidores mais distantes (Ferreira et al., 2006).

Akinwale (2000) e Assunção & Mercadante (2003) ressaltam que o caju é um pseudofruto rico em vitamina C. O valor nutritivo do pedúnculo de caju se revela sob a forma de vitamina C e sais minerais (Souza et al., 2002).

Paiva et al. (2000) afirmam que o pedúnculo contém de 3 a 5 vezes mais vitamina C que a laranja, além de cálcio, fósforo e outros nutrientes. A vitamina C contida no pedúnculo de caju maduro chega a variar entre 156 mg a 455 mg/100 mL de suco cujos valores são considerados altos quando comparados à dose recomendada para ingestão diária, que é de 45 mg.

2.1.2.Biomassa

Usualmente, a denominação biomassa se refere a qualquer matéria de origem vegetal, que dispõe de bioenergia e que, posteriormente, poderá ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final; assim, seriam exemplos de materiais a lenha, os resíduos de serrarias, o carvão vegetal, o biogás resultante da decomposição de lixo orgânico e de outros biocombustíveis líquidos, o bioetanol e o biodiesel. No amplo contexto da bioenergia a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido considerada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. Para esses fins ainda não existem outras alternativas renováveis além dos biocombustíveis, com maturidade tecnológica e viabilidade econômica suficientes(Zhang & Smith, 2007).

No Brasil a biomassa possui, como fonte de energia, vantagens significativas, sobretudo por diversificar a matriz energética brasileira face à dependência externa do país com relação aos combustíveis fósseis (petróleo e gás natural) além de contribuir para o seu desenvolvimento sustentável, em particular com a utilização de mão-de-obra local, principalmente na zona rural, podendo colaborar na garantia do suprimento de energia a comunidades isoladas, em especial nas regiões Norte e Centro-Oeste do país e apresenta vantagens ambientais quando comparada aos combustíveis fósseis, sobretudo em termos de emissão de gases do efeito estufa. Por outro lado, existem aspectos fundamentais e conjunturais significativos que se relacionam com a biomassa como, por exemplo, a necessidade e a oportunidade de utilização eficiente da enorme quantidade de resíduos

agrícolas disponíveis internamente correspondendo a um elevado potencial de geração de energia (Genovese, 2006).

A biomassa lignocelulósica é composta de celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%), além de pequenas quantidades de outros componentes (extrativos) (5-20%) (Tamanini, 2004; Rabelo, 2007).

De acordo com Arantes & Saddler (2010) a celulose é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β-D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β-1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes).

A hemicelulose consiste em cadeias ramificadas de açúcares cujas unidades incluem, sobremaneira, aldopentoses, como xilose e arabinose e aldonhexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém, ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β-D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β-D-galacturônico, além de deoxiexoses. A variedade de ligações e de ramificações e a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (Kootstra et al., 2009).

Segundo Lemos (2011) a lignina não está relacionada a moléculas simples de açúcar não sendo, portanto, pretendida para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Esta fração, porém, desempenha papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise uma vez que dificulta o acesso à celulose. A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas constituindo-se em uma fonte potencial de insumos valiosos para a indústria química (Pereira Júnior et al., 2008).

2.1.2.1. Principais fontes da biomassa

Hoje, a via fermentativa é a forma mais relevante para produzir o bioetanol no Brasil. Um dos fatores que tornam a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país. Segundo Bon et al. (2009) as matérias-primas para produção de etanol podem ser classificadas em função da sua estrutura e complexidade molecular, em:

- i) matérias-primas açucaradas (sacarose, glicose, frutose e lactose) as quais são solúveis e facilmente extraídas da cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino e frutas, presentes no melaço e no soro do queijo;
- ii) matérias-primas amiláceas (grãos de milho, mandioca, trigo, cevada e batata que contêm polissacarídeos insolúveis, necessitando de pré-tratamento térmico para a solubilização e hidrólise;
- iii) matérias-primas lignocelulósicas, insolúveis e recalcitrantes, carecendo de pré-tratamento de natureza mecânica, física ou química, seguidos de hidrólise, preferencialmente enzimática, para produzir açúcares na forma de monômeros e substratos da fermentação alcoólica.

A biomassa lignocelulósica, um complexo que compreende vários polissacarídeos, é uma das matérias-primas mais promissoras considerando-se sua grande disponibilidade e o baixo custo (Cardona & Sanchez, 2007).

2.1.3.Celulose

A celulose é o principal componente presente nos materiais lignocelulósicos. Trata-se de um homopolissacarídeo constituído por unidades de anidroglicopiranose (β -D-glicopiranose) ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→4) glicosídicas formando uma cadeia linear (Figura 2.2). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose (Fengel & Wegener, 1989). A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (Tímár-Balázsc&Eastop, 1998).

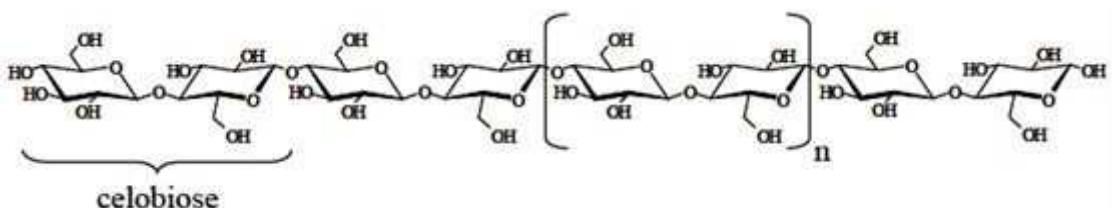


Figura 2.2. Estrutura da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (Tímár-Balázsc&Eastop, 1998)

Combinadas, as longas cadeias de glicose a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm em eletromicrofibrilas tornam a celulose resistente. Em seu conjunto, as microfibrilas são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina formando os materiais lignocelulósicos (Carlile et al., 2002).

2.1.4. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada. As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 2.3).

Estruturalmente, as hemiceluloses, além de mais parecidas com a celulose que com a lignina, são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose dando, ao agregado, estabilidade e flexibilidade (Ramos, 2003).

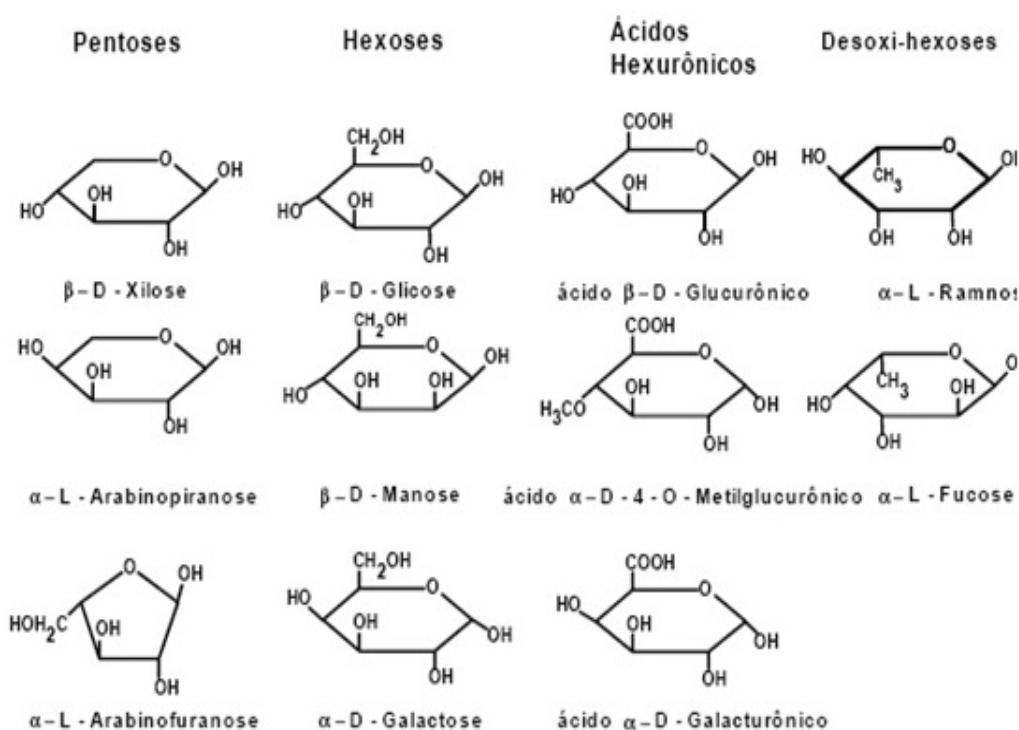


Figura 2.3. Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (Fengel & Wegener, 1989)

Devido à sua estrutura ramificada as hemiceluloses são mais solúveis que a celulose podendo ser isoladas da madeira, por extração. Hemiceluloses são facilmente hidrolisadas por ácido forte deixando a celulose e lignina praticamente intactas (Liu & Wyman, 2005; Lloyd & Wyman, 2005) ou por base forte (Fanet al., 1982). Em muitos casos pré-tratamentos com ácido diluído (0,5-1,0 % H₂SO₄) sob temperaturas elevadas (140-190 °C) hidrolisaram a maioria da hemicelulose em pentoses e hexoses solúveis (Lloyd & Wyman, 2005).

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem diferenças importantes de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose devido principalmente à estrutura física. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas, tornam sua separação quantitativa impossível. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em propriedades significativas para as fibras contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e com o aumento da flexibilidade das fibras (Bianchi, 1995).

2.1.5.Lignina

A lignina, que constitui 10-20% em peso da biomassa seca, é um polímero aromático que contém resíduos fenólicos, tais como álcool trans- ρ -coumaril, álcool trans- ρ -coniferil e álcool trans- ρ -sinápico. A lignina, fração da biomassa não fermentável, é uma fonte potencial de inibidores da fermentação microbiana (Ingram et al., 1999; Maris et al., 2006). É um dos principais componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar; é um polímero derivado de grupos fenilpropanoides, repetidos de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenada do álcool coniferílico. Os polímeros fenil propanoides que constituem a lignina são altamente condensados e muito resistentes à degradação. A lignina é o mais importante componente não-carboidratado da biomassa lignocelulósica; ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o crescimento. Este heteropolímero amorfo é constituído de unidades de fenilpropano (ácido coniferílico ou ferrulico, ácido sinapílico e ácido pcumarílico) conectadas por diferentes ligações (Hendriks& Zeeman, 2009). A Figura 2.4 representa a estrutura molecular da lignina.

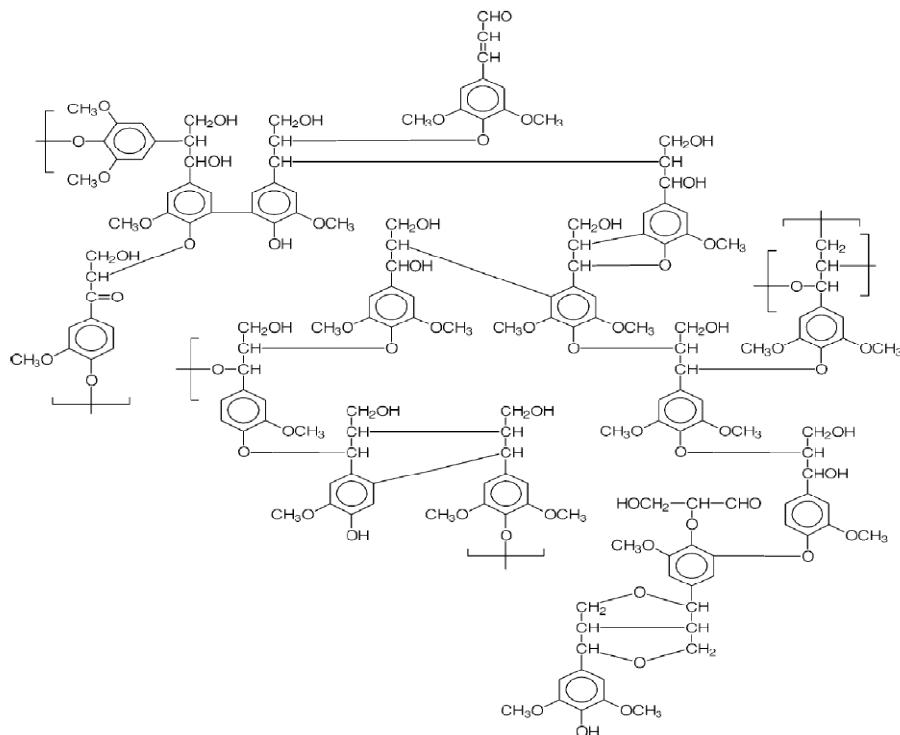


Figura 2.4. Esquema estrutural proposto para a lignina de *Eucalyptusgrandis* (madeira dura) (Piló-Veloso et al.,1993)

2.2. Pré-tratamento

A hidrólise enzimática, usando celulases, é vista como sendo o modo mais atrativo para conversão de celulose em glicose (Ogier et al., 2002; Sheehan, 2001).

A biomassa não tratada é extremamente recalcitrante para digestão enzimática; então, tratamentos termoquímicos têm sido desenvolvidos em grande número visando melhorar a digestibilidade. O pré-tratamento rompe a parede celular da planta e melhora o acesso enzimático aos polissacarídeos. Vários estudos têm mostrado uma correlação direta entre a remoção de lignina e hemicelulose e a digestibilidade da celulose (Gray et al., 2006).

Um pré-tratamento efetivo deve ter uma série de características (Galbe & Zacchi, 2007):

- Resultar na recuperação elevada de todos os carboidratos.
- Resultar em uma digestibilidade elevada da celulose na hidrólise enzimática subsequente.

- c) Resultar em uma concentração elevada de sólidos além de uma concentração elevada de açúcares, liberados na fração líquida. O líquido resultante do pre-tratamento deve possibilitar a fermentação sem necessidade de uma destoxificação prévia.
- d) Requerer baixo investimento e custo operacional.

Wyman et al. (2005) afirmam que a etapa de pré-tratamento pode influenciar bastante o custo da corrente do processo, por determinar a toxicidade da fermentação, a taxa de hidrólise enzimática, a carga de enzima utilizada no processo, o poder de mistura dos reagentes, a concentração e a purificação dos produtos obtidos e a demanda no tratamento de resíduos, entre outras variáveis do processo; portanto, esta etapa de processamento da biomassa vegetal necessita ser de baixo custo, sendo que devem ser evitados o consumo elevado de reagentes químicos, a alta demanda energética e a intensa degradação dos materiais lignocelulósicos.

2.3.Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é realizada com diversos compostos orgânicos (ésteres, açúcares, aminas, etc). Além dos ácidos mais utilizados como os ácidos clorídrico e sulfúrico, outros ácidos são empregados. Ácido fórmico e tricloroacético têm menor atividade, mas produzem reações mais limpas. Ácido oxálico e benzeno-sulfônico são mais ativos que o sulfúrico (Barcza, 2010).

Os processos por ácido concentrado empregam ácido sulfúrico como agente de pré-tratamento, seguido do estágio de hidrólise com ácido diluído. O ácido concentrado desfaz a estrutura cristalina da celulose. Assim que a estrutura da celulose passa ao estado amorfo torna possível sua transformação completa e rápida em açúcares redutores, empregando-se condições não muito severas de reação (Hassuani, 2005).

A hidrólise da celulose catalisada por ácido é uma reação complexa e heterogênea, envolvendo fatores físicos e químicos seguindo o mecanismo de clivagem das ligações glicosídicas β -1,4. Durante a hidrólise ácida a xilose é rapidamente degradada a furfural e outros co-produtos de condensação, os quais são inibitórios a micro-organismos (Rao et al., 2006).

A hidrólise ácida, além de formar compostos inibidores para subsequente fermentação, também apresenta outros problemas tais como condições severas de

manuseio (pH e temperatura), e o alto custo de manutenção devido aos problemas de corrosão (Martin et al., 2007).

2.4.Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática se iniciou no Pacífico Sul, durante a Segunda Guerra Mundial, quando fungos que degradavam roupas e tendas de algodão foram descobertos. O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* foi descoberto por produzir enzimas celulases e desde então vem sendo alvo de diversas pesquisas para adequação a processos industriais (ODN, 2000).

Durante a hidrólise enzimática a celulose é degradada por celulases, produzindo açúcares redutores que podem ser fermentados por leveduras ou bactérias para produção de etanol (Sun & Cheng, 2002).

Diante da heterogeneidade da estrutura da cadeia celulósica, a qual apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e áreas menos ordenadas ou amorfas, a sacarificação enzimática da biomassa depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares cujo sinergismo é essencial para que todo carboidrato nela disponível seja hidrolisado (Pitarelo, 2007).

Usualmente, as celulases são uma mistura de diversas enzimas. Pelo menos três grupos principais de celulases estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose (Figura 2.5):

- 1.Endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase)ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando cadeias com extremidades livres;
2. Exoglucanase ou celobiohidrolase (1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase)
3. β -glicosidase responsável por clivar a celobiose produzindo duas moléculas de glicose.



Figura 2.5. Modo de ação das celulases e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose - Modelo de sinergismo endo-exo (Martins, 2005)

Quando a hidrólise enzimática se processa observa-se, por meio de gráficos de conversão de açúcares *versus* tempo de reação, que há não-linearidade no decorrer da reação, indicando que a uma concentração de enzima a velocidade de reação diminui antes mesmo de todo o substrato ser consumido; alguns fatores colaboram para este comportamento como, por exemplo, a inibição por produto final obtido; baixa reatividade do substrato em virtude, sem dúvida, da sua alta cristalinidade, alto teor de lignina e baixa acessibilidade; perda de enzima gerada por adsorção irreversível e inativação das enzimas ocasionada por condições não devidamente controladas no decorrer da hidrólise enzimática.

A Figura 2.6 representa como a hidrólise enzimática da celulose se processa.

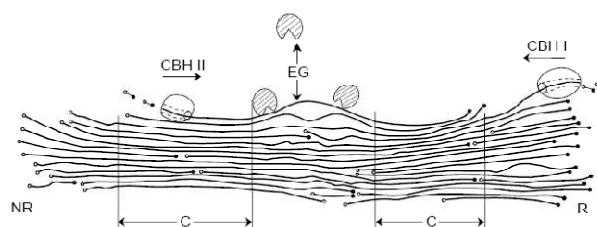


Figura 2.6. Representação esquemática da hidrólise da celulose. C: regiões cristalinas, R: grupos terminais redutores, NR: grupos terminais não-redutores, CBH I e II: exoglucanases e endoglucanase (Teeri, 1997)

As celobiohidrolases 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase I (CBH I) e 1,4- β -glucana-celobiohidrolase II (CBH II) também chamadas exoglucanases de *Trichoderma reesei*, apresentam estrutura tridimensional. A maneira como essas enzimas atuam é diferente. A CBH I é utilizada para iniciar a redução dos grupos terminais redutores (R) da cadeia de celulose enquanto a CBH II atua em direção oposta sobre os grupos terminais não-redutores (Rouvienet al., 1990; Divneet al., 1994). Com base nas estruturas dos seus sítios ativos, CBH I e CBH II têm sido utilizadas na hidrólise de cadeias de celulose mas CBH I é empregada em maior proporção. A celulase é formada por cerca de 60 e 20% de CBH I e CBH II, respectivamente, e 15% de endoglucanase (EG) (Divneet al., 1994). A degradação da celulose cristalina também requer a ação sinérgica entre as endoglicanases e as exoglicanases uma vez que as exoglicanases removem rapidamente as unidades de celobiose recentemente criadas das extremidades formadas pela ação das endoglicanases prevenindo, assim, a reformação das ligações glicosídicas (Lee, 1997).

O modelo sinérgico das enzimas endo-exoglicanases clássico ainda está sendo elucidado em estudo com fungos ou bactérias celulolíticas; entretanto, a heterogeneidade e a multiplicidade dos componentes da celulase mostram grande diversidade de prováveis interações sinérgicas. O sinergismo ocorre também entre os diferentes subtipos de celobiohidrolases, uma vez que algumas enzimas atacam as extremidades redutoras (CBHI) e outras que atacam as extremidades não redutoras (CBHII) das fibras de celulose (Lyndet al., 2002). Um dessas observações é que a CBHI de *Trichodermareesei* pode degradar a celulose altamente cristalina sem a ajuda das endoglicanases. Em contraste, a atividade de CBHII é bastante específica a extremidades não redutoras e trabalha sinergicamente com as endoglicanases. Além disto, Medveet al. (1994) mostraram que CBHI e CBHII competem pelos sítios de ligação, contrapondo-se à hipótese de que essas duas CBHs trabalham sinergicamente.

A hidrólise enzimática reproduz o processo existente na natureza em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas (chamadas celulases, secretadas por fungos ou bactérias, micro-organismos que se alimentam de matéria orgânica, alterando-a e formando substâncias químicas) e a fermentação por leveduras dos açúcares em etanol. O processo de hidrólise enzimática requer o desenvolvimento de micro-organismo capaz de quebrar a celulose, fermentar o açúcar, tolerar altas concentrações de etanol e produzir exclusivamente o etanol (sem subprodutos indesejáveis) (Inovação Unicamp, 2011).

É oportuno salientar, quando se trata de hidrólise enzimática, que no processo enzimático a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático; durante o pré-tratamento a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído ou base; no segundo passo na hidrólise propriamente dita a celulose é quebrada através das enzimas celulases. Devido às condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma quantidade menor de subprodutos é liberada resultando em alto rendimento de açúcares fermentescíveis, porém Duff & Murray (1996), citados por Rabelo (2007), afirmam que o custo da hidrólise enzimática é muitas vezes baixo se comparado com a hidrólise ácida visto que a hidrólise é usualmente conduzida em condições amenas se comparada com a hidrólise ácida de vez que a hidrólise enzimática é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8 e temperatura 45-50°C) e não apresenta problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases; entretanto, para uma hidrólise enzimática eficiente é necessário submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático.

Na hidrólise enzimática o catalisador, além de ser de origem biológica, realiza reações específicas ocasionando menores impactos ambientais porém, para maximizar seu processo de como é necessário controlar diversos parâmetros como temperatura e meio específico, também deve ser levado em conta o maior tempo requerido para completar o processo (Oliveira & Vasconcelos, 2011).

Durante a hidrólise enzimática alguns fatores podem interferir, como: acesso à área de superfície devido à porosidade do material, presença de fibras cristalinas na celulose e presença de lignina e hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose, resultando em redução da eficiência do processo de hidrólise (Sun & Cheng, 2002). Porém a hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, tais como: especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos. Além disto, como as enzimas podem ser empregadas geralmente em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária. Ressalta-se que na hidrólise enzimática há pouca probabilidade de ocorrerem reações indesejáveis que resultem na formação de produtos tóxicos (Biasutti, 2006).

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente e tenham maiores chances de se tornar economicamente viáveis em um

futuro próximo, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro. A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases e este processo extrai do material celulósico açúcares redutores, incluindo a glicose(Rabelo, 2007).

2.5 Fermentação

Entende-se por fermentação o processo de metabolismo anaeróbico de produção de energia em que os micro-organismos oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes gerando produtos modificados de forma a se obter características desejáveis (Santos, 2008).

Santos (2008) afirma que a fermentação alcoólica está intimamente ligada à formação do produto, que é o álcool. Desta forma, tanto o crescimento da levedura como a formação do álcool são influenciados pelas condições que o meio oferece; então, para suprir as exigências das leveduras alguns macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e/ou micronutrientes (enxofre, magnésio, manganês, zinco, cobre, cobalto, entre outros) são adicionados ao mosto a fim de complementar as deficiências do meio quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras para a máxima transformação dos açúcares.

De maneira geral, o processo de fermentação alcoólica consiste das seguintes etapas: a) preparar um meio de cultura adequado à nutrição e desenvolvimento do micro-organismo agente, bem como do acúmulo do produto desejado (etanol) e b) transferir este meio de cultura para um biorreator e inocular o micro-organismo responsável pela fermentação e aguardar que o processo ocorra (Schimidell & Facciotti, 2001).

2.6. Etanol

O etanol (C_2H_5OH) é produzido desde os tempos antigos, pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais (cereais, beterraba e cana); ainda hoje boa parte do etanol industrial é feita por meio da fermentação embora também seja feita sinteticamente de fontes como o eteno derivado do petróleo.

O novo conceito de etanol ou bioetanol álcool de 2^º geração corresponde à sua fabricação utilizando, como matéria-prima, a biomassa lignocelulósica. Essas matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha

do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar) e o conceito de biorrefinarias, emergem como fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos. A produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica utiliza processos químicos (empregando ácidos) ou da biotecnologia moderna (empregando enzimas) para a quebra de moléculas de celulose e produção de açúcares, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos alcoólicos da biotecnologia convencional. O uso da biotecnologia para converter celulose em etanol abre grandes perspectivas para as empresas que atuam no desenvolvimento de enzimas (Kammet al.,2005).

2.7. Estado da arte

Neste item serão abordados trabalhos referentes ao estudo da produção do etanol utilizando-se leveduras *Saccharomyces cerevisiae* no fermentado do caju,independente da sua fonte de origem.

Ostrowski et al. (2006) estudaram a obtenção do álcool etílico hidratado a partir do amido de mandioca no qual foi feita uma gelatinização seguida da conversão enzimática dos constituintes deste amido em glicose, utilizando as enzimas α amilasee βamilase. A glicose obtida foi convertida em álcool etílico via hidrólise enzimática utilizando-se leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). O rendimento obtido foi cerca de 38% após a destilação do mosto fermentado.

Silva (2007) realizou o estudo do processo biotecnológico para conversão de algaroba [*Prosopis juliflora(Sw.) D.C.*] em etanol a partir do extrato aquoso obtido da farinha da algaroba fermentado por *Saccharomyce scerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. Foram realizadas as seguintes etapas: caracterização da farinha da algaroba quanto à composição química e microbiológica; determinação da concentração ideal de farinha da algaroba para elaboração do substrato fermentativo; curvas de crescimento dos micro-organismos; fermentações segundo o planejamento fatorial 2³. Verificou-se que a farinha de algaroba apresenta elevados níveis de nutrientes, sobretudo em açúcares e minerais como fósforo cálcio, além de ser considerada própria quanto à qualidade higiênico-sanitária. Foi escolhida a concentração de 30% de farinha da algaroba para elaboração do substrato por apresentar estabilidade quanto à solubilização de glicose e de proteínas

totais no meio. *Zymomonas mobilis* apresentou maior crescimento em meio padrão em condição estática e *Saccharomyces cerevisiae* no substrato sob agitação. De acordo com o planejamento fatorial, a maior produção de etanol foi obtida utilizando extrato aquoso da algaroba fermentado por *Z. mobilis* em condição estática. Conclui-se que a algaroba se apresenta como matéria-prima viável em processos biotecnológicos, visando ao seu aproveitamento e conferindo maior valor agregado ao produto.

Pavlak et al. (2007) utilizaram o aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignyamartiana*) para obtenção de etanol. O trabalho teve por objetivo desenvolver e aperfeiçoar o processo de produção de álcool a partir do mesocarpo do babaçu e calcular os rendimentos do processo. Durante a fermentação o mosto foi analisado quanto ao teor de açúcares residuais, pH, acidez e densidade relativa. As variáveis otimizadas foram pH e temperatura, por meio da análise da conversão do amido em glicose. As condições otimizadas para a α -amilase foram 100 °C a pH = 6 e para amiloglucosidase de 60 °C, pH = 4. A hidrólise enzimática apresentou, nessas condições, um rendimento de 93%. O tempo de fermentação foi estipulado em 12 h, conforme os parâmetros fermentativos analisados. A quantidade de álcool produzida, aproximadamente 3°GL, não foi afetada pela agitação; esta concentração mostra que a fermentação apresentou um rendimento de 98%.

Tavares et al. (2007) avaliaram a produção de etanol utilizando, como matéria-prima, a batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] cultivada no estado do Tocantins; o objetivo deste trabalho foi quantificar a produção de etanol (em escala piloto) utilizando-se como matéria-prima, seis acessos de batata-doce, cultivados em Palmas, TO. Para tanto, os acessos foram colhidos e as raízes lavadas; após a lavagem e a Trituração das raízes os acessos de batata-doce foram submetidos ao processo de hidrólise do amido da batata-doce; assim, as raízes dos acessos foram trituradas e transferidas para a dorna de cozimento, e hidratadas com água potável, na proporção massa ralada/água 2:1; a hidrólise foi procedida via enzimática através da atuação das enzimas alfa-amilase e glucoamilase, na concentração de 3 e 2 mL/kg de amido, respectivamente. A fermentação foi realizada através da adição de fermento de panificação (*S.cerevisiae*) no meio numa concentração de 5 g/L de meio hidrolisado (p/v) e após 36h de fermentação o meio foi destilado; nas condições analisadas o genótipo BD#022 (137,2 L/t) e BD#106 (101,84 L/t) se destacaram quanto às maiores produções de etanol por tonelada de raiz; entretanto, acessos de batata-doce com maiores produtividades (40 a 50 t/ha) ainda não foram avaliados evidenciando-se um potencial mais elevado, pelo qual novos testes deverão ser

realizados quanto à quantificação e qualificação do etanol obtido, enquanto a otimização no processo de produção, deverá ser realizada.

Segundo Raia et al. (2009) o caju representa, para a região Nordeste, uma atividade econômica de grande expressão; no entanto, apenas 15% do pedúnculo, parte suculenta, são aproveitados para a produção do suco e derivados do pseudofruto. O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética da fermentação alcoólica do suco de caju utilizando-se a levedura industrial fornecida por uma indústria sucroalcooleira e com a finalidade de produzir etanol hidratado. O processo de fermentação alcoólica foi realizado em batelada. No estudo cinético da fermentação alcoólica foram monitorados, em intervalos de 2 em 2 h, os seguintes parâmetros: pH, acidez total (mg/100mL), SST ($^{\circ}$ Brix), temperatura, concentração de etanol (g/L) e a concentração de levedura (g/L). O processo de destilação do fermentado foi realizado em destilador de alambique adaptado com capacidade para destilar até 93 $^{\circ}$ GL. A concentração de etanol foi de 5,6 $^{\circ}$ GL e a acidez total, de 0,36g/mL;a destilação do fermentado produziu o álcool hidratado com uma graduação alcoólica de 81 $^{\circ}$ GL.

Santos & Gouveia (2009) estudaram a produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento por explosão a vapor e hidrólise enzimática para a conversão de celulose em glicose. A hidrólise enzimática também foi realizada com material deslignificado. As fermentações foram realizadas em meios à base dos hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar, a 30 $^{\circ}$ C. As eficiências das hidrólises enzimáticas alcançaram 44%, independente do material utilizado entretanto, a hidrólise com o material deslignificado foi 30% mais rápida e a deslignificação aumentou em 10% o rendimento de bioetanol em relação à glicose e em 96% em relação ao bagaço.

Bragatto (2010) avaliou o potencial das cascas de eucalipto *Eucalyptus* spp frente à produção de etanol combustível. Desta maneira, as cascas de 5 clones comerciais foram caracterizadas quanto à composição química; as cascas de eucalipto foram submetidas a uma série de pré-tratamentos ácidos e alcalinos, avaliados em planejamentos fatorial apresentaram aproximadamente 20% de carboidratos solúveis totais-CST (glicose, frutose e sacarose). Os CST foram extraídos com água quente a temperatura de 80 °C e em seguida fermentados com leveduras convencionais (*S.cerevisiae*). A produção de etanol por tonelada de casca seca foi de 106 litros (etanol de primeira geração); após a extração dos CST as biomassas residuais das cascas de eucalipto foram submetidas a uma série de pré-tratamentos. O pré-tratamento alcalino (NaOH) apresentou eficiência enzimática de conversão da glicose de aproximadamente 30% após 24 h de incubação. Com os

resultados obtidos da hidrólise enzimática, estima-se que possam ser produzidos mais 94 L de etanol por tonelada de casca livre de extractivos (etanol celulósico).

Shulz (2010) estudou a produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana com o objetivo de estabelecer as condições ideais da fermentação alcoólica da polpa e das cascas de banana nanica visando ao aumento do rendimento e da produtividade do processo. Os estudos foram desenvolvidos em quatro diferentes etapas: (1) caracterização dos resíduos in natura de polpas e cascas de banana; (2) pré-tratamento térmico e ácido sobre a deslignificação dos resíduos; (3) hidrólise enzimática sobre a despolimerização dos resíduos e (4) fermentações em frascos Erlenmeyer com frequência de agitação de 120 min, 30 °C, durante 48 h e em biorreator de bancada com frequência de agitação de 150 min, 30 °C e pH controlado automaticamente em $4,5 \pm 0,1$. Os volumes de trabalho foram utilizados no biorreator de bancada de 2 L e nos frascos Erlenmeyer de 100mL, com 20% v/v de inóculo usando como agente de fermentação alcoólica, a levedura *S.cerevisiae*. Nas mesmas condições operacionais de fermentação utilizadas, o aumento da concentração inicial da polpade banana in natura de 250 para 500 g não conduziu a valores diferentes de rendimento e produtividade em etanol. A polpa de banana apresentou valor médio de 61,1 g de açúcar e proporcionou, em média, uma concentração final de 29,8 g de bioetanol após 8 h de fermentação. A polpa mostrou alto potencial para uso na produção de etanol; já nas cascas como único substrato fazem-se necessários estudos complementares.

Silva (2010) estudou a produção do bioetanol carburante empregando uma concepção de processo denominado SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) a partir da celulose contida no resíduo oriundo do sistema de decantação da indústria de celulose e utilizando linhagens de *S.cerevisiae*, visando estabelecer condições que aumentassem a produtividade e a eficiência do processo. Como resultados desta dissertação foram obtidas as melhores condições da pré-hidrólise enzimática (relação sólido:líquido 1:4 e 17,5 FPU/g de carga enzimática) e determinadas as condições que conferiram o maior valor para a produtividade volumétrica (16 h de pré-hidrólise enzimática, 8 g/L para concentração celular e 36 h de fermentação). A máxima concentração de etanol obtida quando o processo SSF foi conduzido em frascos agitados, foi de 77,6 g/L em 64 h, empregando-se *Saccharomyces cerevisiae* de panificação. O melhor resultado obtido quando a fermentação foi conduzida em biorreator, foi de 74,6 g/L em 64 h, utilizando celulases comerciais (Multifect) e suplementando o hidrolisado enzimático com fontes de fosfato e nitrogênio e soluções de sais minerais e ácido cítrico,

que foi fermentado por uma cepa industrial de *S.cerevisiae* codificada como JP1 cujos resultados se mostraram bastante promissores e apontam para maiores desdobramentos.

Rueda et al. (2010) estudaram o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido fosfórico e sulfúrico diluído para produção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática. Este trabalho apresenta a produção da glicose por hidrólise enzimática do bagaço da cana pré-tratada com dois ácidos diluídos. Foram avaliados os melhores valores para as variáveis dos ácidos diluídos para o pré-tratamento que influenciaram na produção de glicose na hidrólise enzimática, tais como, concentração de ácido e tempo de pré-tratamento; o delineamento experimental foi utilizado para se comparar os seguintes fatores: concentração de ácido sulfúrico e fosfórico (0,5 para 3,5%) e tempo de reação (15 a 180 min), enquanto a temperatura do pré-tratamento e a concentração dos sólidos foram mantidos constantes em 130 °C e 10% em peso do bagaço. A concentração da glicose máxima atingida foi 404,5 mg de glicose/grama de bagaço in natura para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e 414,9 mg de glicose/g bagaço in natura para o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

Lima et al. (2012) obtiveram, estudando a produção de bioetanol e utilizando a hidrólise ácida na matéria-prima sisal, eficiência de fermentação alcoólica de 92% com a levedura industrial *S.cerevisiae* conseguiram a melhor eficiência do pré-tratamento operando o processo na temperatura de 105 °C com 3% de H₂SO₄, liberando principalmente pentoses no licor pré-hidrolisado. A hidrólise ácida do bagaço mais eficiente foi operada usando-se 3% de H₂SO₄ na temperatura de 160 °C na razão bagaço: ácido de 1:10, obtendo-se a liberação máxima de glicose no licor de 5,8 g/L.

CAPÍTULO III

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transferência de Calor e Massa em Meios Porosos e Sistemas Particulados – LTCMMP e no Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande.

3.2. Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas nesta pesquisa foram bagaço do pedúnculo do caju e o bagaço de cana-de-açúcar (utilizados para comparação com o bagaço do caju).

O bagaço de caju foi adquirido na indústria de produção de sucos, FRUTNAT, localizada na cidade de Campina Grande, PB, que foi transportada para o local de processamento (LTCMMP) onde, inicialmente, ocorreram duas lavagens com água destilada quente no bagaço do pedúnculo do caju, na temperatura em torno de 50 °C e um tempo de 20 min para cada lavagem. Após as lavagens com água quente o bagaço foi submetido às duas lavagens com água destilada em temperatura ambiente paralixiviação dos açúcares remanescentes durante a extração do suco, até atingir °Brix zero.

Do bagaço de cana-de-açúcar foram adquiridos 3kg, em lanchonetes da cidade de Campina Grande, os quais foram transportados para o LTCMMP e lavados em água corrente da rede de abastecimento da cidade, até atingir °Brix zero. Este bagaço foi utilizado para hidrólise enzimática visando aos efeitos comparativos com o bagaço de caju.

Após as lavagens os bagaços foram levados em bandejas para secar em uma estufa com circulação de ar, na temperatura de 55 °C, no tempo de 48 h; em seguida, o material foi retirado, moído e peneirado a 48 mesh para reduzir a granulometria e posteriormente envasado a vácuo em sacos plásticos de polietileno com aproximadamente 200 g e armazenados em caixas hermeticamente fechadas para uso posterior.

Na Figura 3.1 se encontra o fluxograma do processamento para obtenção dos bagaços secados a 55°C, utilizados no processo de hidrólise.

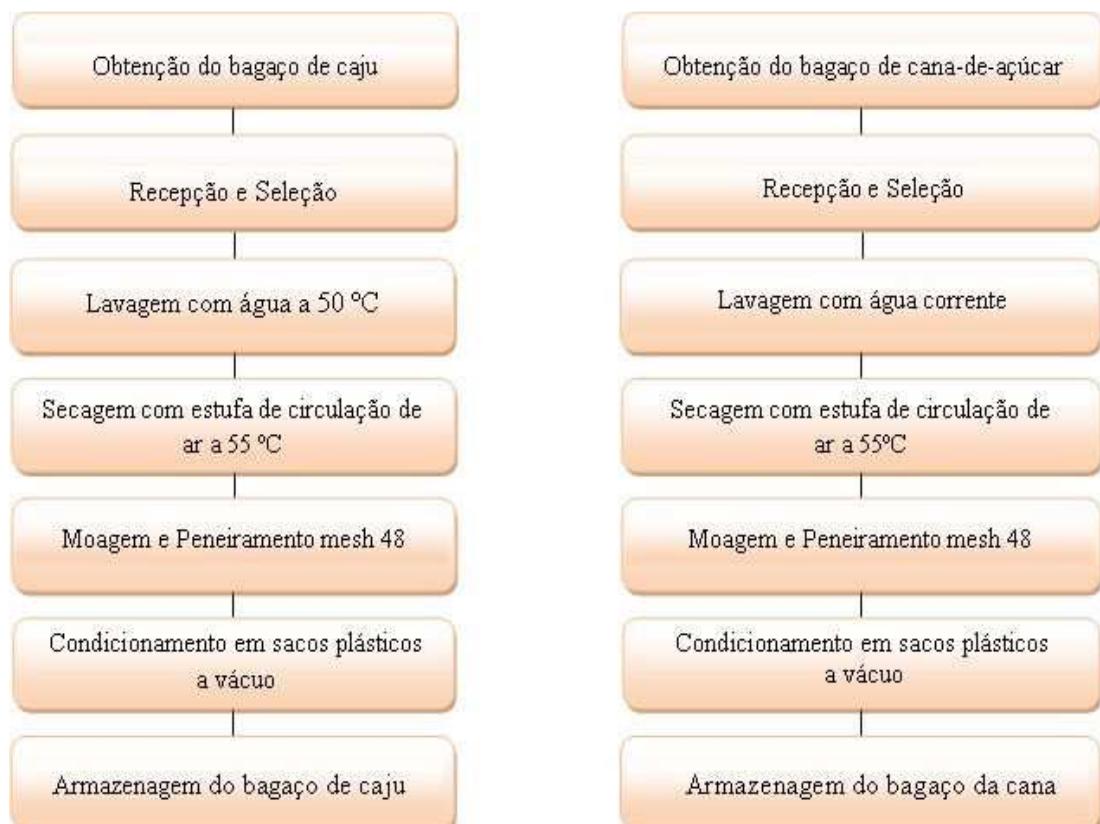


Figura 3.1. Fluxogramas apresentando cada uma das etapas do processamento do bagaço (seco) do pedúnculo do caju e da cana-de-açúcar

3.3. Caracterização do bagaço do pedúnculo do caju e bagaço de cana

Buscando comparar as características físico-químicas do bagaço do pedúnculo do caju e da matéria-prima lignocelulósica mais abundante na agroindústria brasileira (bagaço de cana), foram realizadas as análises de pH, umidade, celulose, lignina, °Brix-sólidos solúveis totais, extractivos dessas matérias-primas.

3.3.1.1. Determinação de pH

O pH foi determinado de acordo com a metodologia de Brasil (2005);nesta análise foi preparada uma suspensão com 10mL de água destilada e 0,5g da amostra sólida; após a homogeneização a suspensão foi deixada em repouso durante de 30 min; depois, o pH foi mensurado em pHímetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões.

3.3.1.2. Determinação de umidade

A umidade foi determinada de acordo com a metodologia de Brasil (2005);a análise do teor de umidade (% b.u.) consistiu em se pesar de 3 a 5 g da amostra em cadinho de porcelana previamente secado e tarado. Os cadinhos foram colocados em estufa a 105 °C por 24 h.

$$Umidade = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3.1)$$

m_i - massa inicial do bagaço (g)

m_f - massa final do bagaço (g)

3.3.1.3. Teor de celulose

Os teores de celulose nos materiais utilizados foram determinados conforme metodologia daTAPPI (2010). Para os bagaços secos e moídos foram pesados 2 g da amostra à qual foi adicionada uma mistura de ácido acético a 80% com o ácido nítrico a 70% na proporção de 10:1, v/v. As amostras foram digeridas por 60 min em refluxo a 60°C;após esta etapa se adicionaram 150mL de água destilada e se elevou a temperatura para 105°C, por mais 60 min;no final deste período desligou-se o sistema e as amostras foram filtradas a vácuo por meio de um papel de filtro quantitativo número 40, já tarado; o precipitado foi separado e determinado gravimetricamente, como celulose total.

3.3.1.4. Teores de lignina

Os teores de lignina foram determinados de acordo com a metodologia da TAPPI (2010); neste método 2 g das amostras livres de extractivos foram adicionados a 15mL de H₂SO₄ (72%), v/v em um erlenmeyer de 250 mL; deixou-se o sistema ácido/bagaço agitando por 1 h, a temperatura de 40 °C; após este tempo a pasta negra foi transferida quantitativamente para um balão de 500 mL conectados a um sistema de refluxo usando-se aproximadamente 255 mL de água destilada; para a pós-hidrólise com ácido sulfúrico a 4% elevou-se a temperatura para 105°C que foi deixado para refluxar por 2 h; após esta etapa o resíduo foi filtrado sendo o licor separado para determinação de lignina solúvel e o resíduo lavado exaustivamente com água destilada, até remoção do ácido; após a filtragem e a lavagem o material retido no filtro foi denominado lignina de Klason, e mantido em estufa a 105°C até massa constante e determinado gravimetricamente.

3.3.1.5. Teor de sólidos solúveis (°Brix)

Foi determinado de acordo com a metodologia de Brasil (2005) através da análise e concentração de sólidos solúveis em °Brix; para isto, foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do resíduo, agitados até perfeita homogeneização e deixados em suspensão por 30 min, período após o qual a suspensão foi filtrada com algodão e feita a leitura em refratômetro cujo resultado foi multiplicado por dez devido à diluição para determinar o teor de sólidos solúveis do resíduo.

3.3.1.6. Análise do teor de extractivos

Nesta análise foi obedecida a norma padronizada pela TAPPI (2010) em que amostras de 5g de bagaço do pedúnculo do caju como resíduo lignocelulósico foram submetidas a extração em sete solventes diferentes (acetona, tolueno/etanol (2:1), etanol 95%, ciclohexano/etanol (2:1), clorofórmio, hexano e diclorometano) em aparelho tipo Soxhlet, acondicionadas em cartucho confeccionado em papel de filtro quantitativo previamente tarado, durante; 8 h; em seguida, os solventes foram removidos sob pressão reduzida em um evaporador rotatório e os resíduos obtidos no cartucho seguiram para secagem em estufa a 105°C até massa constante, visando à determinação do teor de extractivos totais. O procedimento foi realizado em triplicata para cada solvente usado e a porcentagem de extractivos foi determinada com base na diferença de massa.

$$\%Ext = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Em que:

% Ext - Porcentagem de extractivos

m_i - massa inicial (g)

m_f - massa final (g)

3.4. Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise enzimática foi dividido em três etapas:

Primeira etapa – Utilizou-se como ferramenta um planejamento fatorial 2^3 , em que as variáveis a serem definidas, foram: o tipo de pretratamento ácido no bagaço de cajupara retirada de hemicelulose (ácido sulfúrico e ácido fosfórico separadamente) e deslignificação básica(NaOH) tempo do pretratamento ácido e efeito da atividade enzimática na hidrólise do bagaço de caju após pretratamento.

Segunda etapa - Com o material produzido nas melhores condições da primeira etapa, foram realizadas novamente hidrolises enzimáticas porém com maiores teores de atividade.

Terceira etapa – Realizou-se hidrólise enzimática com o bagaço da cana-de-açúcar nas condições reportados por Rueda et al. (2010) apenas para efeito comparativo com os resultados do bagaço de caju.

O processo de hidrólise do material do bagaço do caju foi uma adaptação das metodologias empregadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

3.4.1.Primeira etapa: Planejamento experimental ^{2³} da hidrólise enzimática do bagaço do caju prétratado com ácidos e hidróxido de sódio

O pré-tratamento ácido foi utilizado como variável de entrada do planejamento experimental objetivando-se verificar se os efeitos ácidos influenciariam na hidrólise enzimática no que diz respeito à produção da glicose. Os ácidos utilizados foram ácido sulfúrico e ácido fosfórico. Avaliou-se a variação da concentração do ácido e do tempo do pretratamento; o uso do hidróxido foi realizado sempre após cada tratamento ácido sendo a concentração de 1,5% de NaOH.

Nesta etapa não foi determinado o teor de hemicelulose, celulose e lignina dos bagaços após prétratamento. Optou-se por avaliar o efeito do prétratamento no bagaço isento de ácidos e base retirados por lavagem com água destilada até pH neutro, após a hidrólise enzimática, visando avaliar, apenas como variável resposta, a glicose produzida no tempo de 48 e 72 h.

Na Tabela 3.1 se encontram respectivamente, os níveis reais e codificados das variáveis de entrada no processo de hidrólise da primeira etapa.

Tabela 3.1. Valores codificados e reais das variáveis de entrada

Fatores	-1	0	+1
% ácido para o pré-tratamento	0,5	2	3,5
Tempo de prétratamento (min)	15	97	180
Atividade das Celulases em (FPU) usado na hidrólise no bagaço prétratado	0,050	0,075	0,100

Na Tabela 3.2 Estão os valores reais e os níveis codificados dos fatores estudados nos 11 experimentos na matriz do planejamento para a hidrólise enzimática do bagaço de caju para cada ácido estudado, totalizando 22 experimentos.

Tabela 3.2. Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 para o hidrolisado prétratado com ácido sulfúrico e ácido fosfórico

Experimento	%ácido	Tempo de pretratamento (min)	Atividade celulolítica (FPU)
1	- 0,5	- 15	- 0,05
2	+ 3,5	- 15	- 0,05
3	- 0,5	+ 180	- 0,05
4	+ 3,5	+ 180	- 0,05
5	- 0,5	- 15	+ 0,1
6	+ 3,5	- 15	+ 0,1
7	- 0,5	+ 180	+ 0,1
8	+ 3,5	+ 180	+ 0,1
9	2	97	0,075
10	2	97	0,075
11	2	97	0,075

3.4.1.1. Pré-tratamento ácido

Para o pretratamento ácido utilizaram-se 10 g de resíduo do pedúnculo do caju em base seca em cada amostra a qual foi tratada com soluções de ácidos (ácido fosfórico pureza 85% e ácido sulfúrico pureza 95% marca VETEC/PA, com concentrações de 0,5; 2,0 e 3,5%). O pretratamento ácido foi feito separadamente para cada um; em seguida, 100 mL de cada solução junto com a amostra foram colocados em um reator de aço inox

da Maintec Fornos INTI com controlador térmico FE50RP. As reações foram conduzidas na temperatura de 130 °C, nos tempos de 15, 97, 180 min, conforme combinação apresentada na Tabela 3.2 do planejamento experimental. A Figura 3.2apresenta o reator no qual foram realizados os tratamentos ácidos.



Figura 3.2.Reator utilizado nos experimentos para as hidrólises ácidas

Após o tratamento ácido o bagaço foi lavado com água destilada até pH neutro; depois foi filtrado e o sólido retido foi tratado com 1,5% de NaOH em 100°C; novamente o sólido foi lavado com água destilada até pH neutro; após o prétratamento ácido e básico foram realizadas as hidrólises enzimáticas variando-se as atividades enzimáticas conforme combinação do planejamento apresentado na Tabela 3.2.

Os tempos de hidrólises foram de 48 e 72 h para verificar qual deles apresentava melhor resposta em termos de glicose.

3.4.1.2. Enzima usada e determinação da atividade enzimática

A celulase utilizada obtida foi produzida de fonte microbiana utilizando-se o *Aspergillus niger*C1184-5KU (Sigma-Aldrich).

O método de NREL (2008) foi utilizado para determinação das celulases que se baseiam na produção de açúcares redutores quando a enzima está em contato com o substrato, papel de filtro de celulose Whatman nº 1.

1) Inicialmente foram colocados, em tubos de ensaio, 50 mg do papel de filtro em contato com 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L em pH 4,8.

2) Adicionou-se 0,5 mL de enzima, anteriormente diluída em tampão citrato, em concentrações que possam, após processo de redução (etapa posterior) gerar

aproximadamente 2 mg de açúcares redutores expressos em glicose, nas condições de reação e incubação da enzima.

3) Deixou-se a enzima incubada com o substrato a 50 °C por 60 min.

4) Após esse tempo foram colocados 3 mL de DNS, misturando-se bem a solução.

5) As soluções seguiram para fervura durante exatamente 5 min em banho com água fervente; após esta etapa os tubos foram colocados em banho de água fria até temperatura ambiente.

6) Adicionaram-se mais 5 mL de água deionizada (ou quantidade de água suficiente para ter leitura no espectro dentro da faixa linear de absorbância versus concentração-curva padrão) misturando-os bem, foram feitas leituras no espectrofotômetro a 540 nm.

Obteve-se o zero do espectrofotômetro com uma solução que contém 1,5mL de tampão citrato, 3,0 mL de DNS e após mistura seguem os mesmos passos das etapas 5 e 6.

Anteriormente preparou-se a realização dos testes de atividade, isto é uma curva de calibração da glicose não só para que fosse possível determinar a concentração de glicose liberada em cada reação enzimática mas também para seguir a definição de Filter Paper Unit- FPU explicada na etapa 2).

A curva padrão foi preparada utilizando-se uma solução estoque de glicose anidra a 10 mg/mL em tampão citrato a 0,05 mol/L; os tubos padrões da glicose continham as seguintes concentrações (6,7 ou 3,35 mg/0,5mL; 5 ou 2,5 mg/0,5 mL; 3,3 ou 1,65 mg/0,5 mL e 2 ou 1,0 mg/0,5 mL), com teores de diluição 1:1,5; 1:2; 1:3; 1:5, respectivamente; depois da preparação das amostras foram colocados 0,5 ml da amostra padrão e 1 mL do tampão citrato e se procedeu novamente às etapas de 4 a 6.

A concentração da enzima estimada exatamente para 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de Filter Paper Unity - FPU) foi feita por meio da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação enzimática e os logaritmos das respectivas diluições da enzima.

Cálculo da unidade de atividade expresso em FPU

A unidade de FPU é baseada na Unidade Internacional (IU)

1 UI = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de substrato convertido

= 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de glicose (redução de açúcares em glicose) formada sobre a reação de hidrólise

= 0,18 mg min^{-1} quando o produto é glicose

A quantidade absoluta de glicose encontrada na FPU é igual à diluição crítica em 2,0 mg

$$2 \text{ mg de glicose} = 2/0,18 \mu\text{mol}$$

Esta quantidade de glicose foi produzida por 5 mL de enzima em 60 min, assim:

$$2 \text{ mg de glicose} = 2/(0,18 \mu\text{mol} \times 0,5 \text{ mL} \times 60 \text{ min}) = 0,37 \text{ UI mL}^{-1}$$

Portanto, estima-se que a quantidade de enzima na qual se encontram 2,0 mg de glicose na FPU que reagiu, contém 0,37 unidades;

$$\text{FPU} = (0,37/\text{quantidade de enzima encontrada em 2mg de glicose}) \text{ mL}^{-1}$$

3.4.1.3. Ensaios de hidrólise enzimática

Dois gramas de bagaço de caju pretratado foram hidrolisados com a enzima comercialmente disponível. O bagaço pretratado foi colocado em Erlemnayers de 250 mL, juntamente com 45 mL da solução tampão (2g ácido cítrico/7g citrato de sódio), pH 4,8, em que foi dissolvida a enzima para se ter atividades em FPU, conforme matriz do planejamento descrito na Tabela 3.2. A hidrólise enzimática para sacarificação ocorreu nos bagaços contidos nos Erlemnayes acondicionados na T = 50°C em incubadora shaker (Marconi MA-420) agitada a 150 rpm, nos tempos 48 e 72 h, quando então foram coletadas as amostras para determinação da glicose.

3.4.2. Segunda etapa: Hidrólise do bagaço de caju produzido pelo melhor prétratamento

Nesta etapa os testes de hidrólise do bagaço de caju foram realizados da mesma forma que a da primeira, exceto que o bagaço de caju escolhido foi o que mais produziu glicose nas condições submetidas ao planejamento aplicado na primeira etapa em que as

atividades usadas para a hidrólise da segunda etapa foram 7 FPU e 5 FPU e os tempos de hidrólise foram os mesmos, 48 e 72 h.

3.4.3. Terceira etapa: Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Os testes de hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar foram realizados da mesma forma que o bagaço de caju na segunda etapa, exceto que o bagaço de cana não sofreu qualquer pretratamento.

3.5. Quantificação dos açúcares da hidrólise

Os teores de açúcares foram determinados de acordo com a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory - NREL* (2008); as análises de açúcares foram realizadas através de cromatografia líquida, utilizando-se do HPLC; os dados do cromatógrafo e as condições das operações foram os seguintes: cromatógrafo líquido equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian); Injetor manual com loop de 20 µL; Detector de índice de refração modelo ProStar 356 (Varian); Coluna analítica de aço inox Hi-Plex H (300 x 7,7 mm; Varian); Temperatura da coluna de 40 °C; Fase móvel: água miliQ com vazão de 0,6 mL/min; Tempo de análise: 15 min. Soluções padrão internos de açúcares glicose, frutose, xilose, arabinose e sacarose (Sigma 99,99% grau HPLC) foram utilizadas na quantificação do teor de açúcares do licor.

3.6. Fermentação alcoólica do licor sacrificado do bagaço de caju

3.6.1. Preparação do inóculo

Foram utilizados 10g da levedura selecionada ativa FT858 (industrial da GIASA) dalinagem *S. cerevisiae*, em 1L de água destilada, 100 g de açúcar comercial e as quantidades dos nutrientes 0,6 e 0,12 sulfato de amônio e fosfato de potássio, respectivamente, iniciando-se o processo de reativação da levedura. Com o auxílio de uma bomba o sistema foi ativado e alimentado de uma garapa, a cada meia hora, durante o tempo de 2 h sob aeração constante, com o objetivo de prover o oxigênio evitando, com isto maior produção de etanol e viabilizando a reprodução celular.

Após o aumento da massa celular o inóculo foi centrifugado em centrífuga da marca excelsa II modelo 206 BL com velocidade de 1500rpm (rotação por minuto) e colocado em cubetas de 100 mL totalizando 400 mL para cada 5 min de centrifugação com o objetivo da separação dos sólidos em suspensão no meio.

3.6.2. Inoculação do micro-organismo no licor hidrolisado

Após as etapas de preparação do inóculo seguiu-se a inoculação do micro-organismo no licor hidrolisado começando, assim, a etapa de produção de etanol *emerlenmeyers* de 250 mL, utilizando-se 30 g de levedura *S. cerevisiae* selecionada e ativada modelo LNF FT-858, já centrifugada e filtrada. O processo da fermentação alcoólica do bagaço do caju adaptou-se às metodologias empregadas do artigo de Silva (2007), adicionando-se-lhes fontes de nutrientes (fósforo e nitrogênio) nas quantidades em g/L⁻¹, de forma a proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento do micro-organismo.

A fermentação alcoólica ocorreu em incubadora Shaker Marconi modelo MA-420, a temperatura de 30 °C e rotação de 150 rpm, quando foram utilizados 60 mL de licor, e coletadas alíquotas de 1,5 mL, em períodos regulares de 0, 2, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 h, para definir o perfil cinético da fermentação alcoólica.

3.7. Rendimento em etanol

Os valores de rendimento das fermentações, representados pelo fator de conversão de açúcares totais em etanol (YP/AT) foram calculados de acordo com a Equação 3.3

$$y_{P/AT} = \frac{(P_f - P_0)}{(AT_0 - AT_f)} \quad (3.3)$$

em que:

P_f– concentração de etanol no tempo final de fermentação (g/L)

P₀– concentração de etanol no início do processo fermentativo (g/L)

AT₀– concentração de Glc, Frt e Scr no início da fermentação (g/L)

AT_f– concentração dos açúcares Glc, Frt e Scr no tempo final de fermentação (g/L)

Definiu-se como tempo final de fermentação- t_f, o tempo correspondente à máxima concentração de etanol no caldo fermentado (min).

3.8. Produtividade total em etanol

Os valores de produtividade total em etanol de cada processo (Q_p), expresso sem massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume (g/h/L) foram obtidos por meio da Equação 3.4, conforme definição de Gaden Júnior (1959).

sendo:

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (3.4)$$

P_f - concentração de etanol no tempo final de fermentação (g/L)

P_0 - concentração de etanol no início do processo fermentativo (g/L)

t_f - tempo final de fermentação correspondente à máxima concentração de etanol no caldo fermentado (min)

3.9. Eficiência do processo fermentativo (ϵ)

Os valores de rendimento foram comparados ao rendimento teórico máximo obtido nas fermentações alcoólicas, que deve ser igual a 51,11% (Sharma et al., 2007). Para se obter a eficiência do processo utilizou-se a Equação 3.5.

$$\epsilon = \frac{Y_p / At}{0,5111} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Na Figura 3.3 estão as etapas do processo para obtenção do álcool etílico proveniente do licor oriundo do bagaço do pedúnculo do caju secado via hidrólise enzimática.

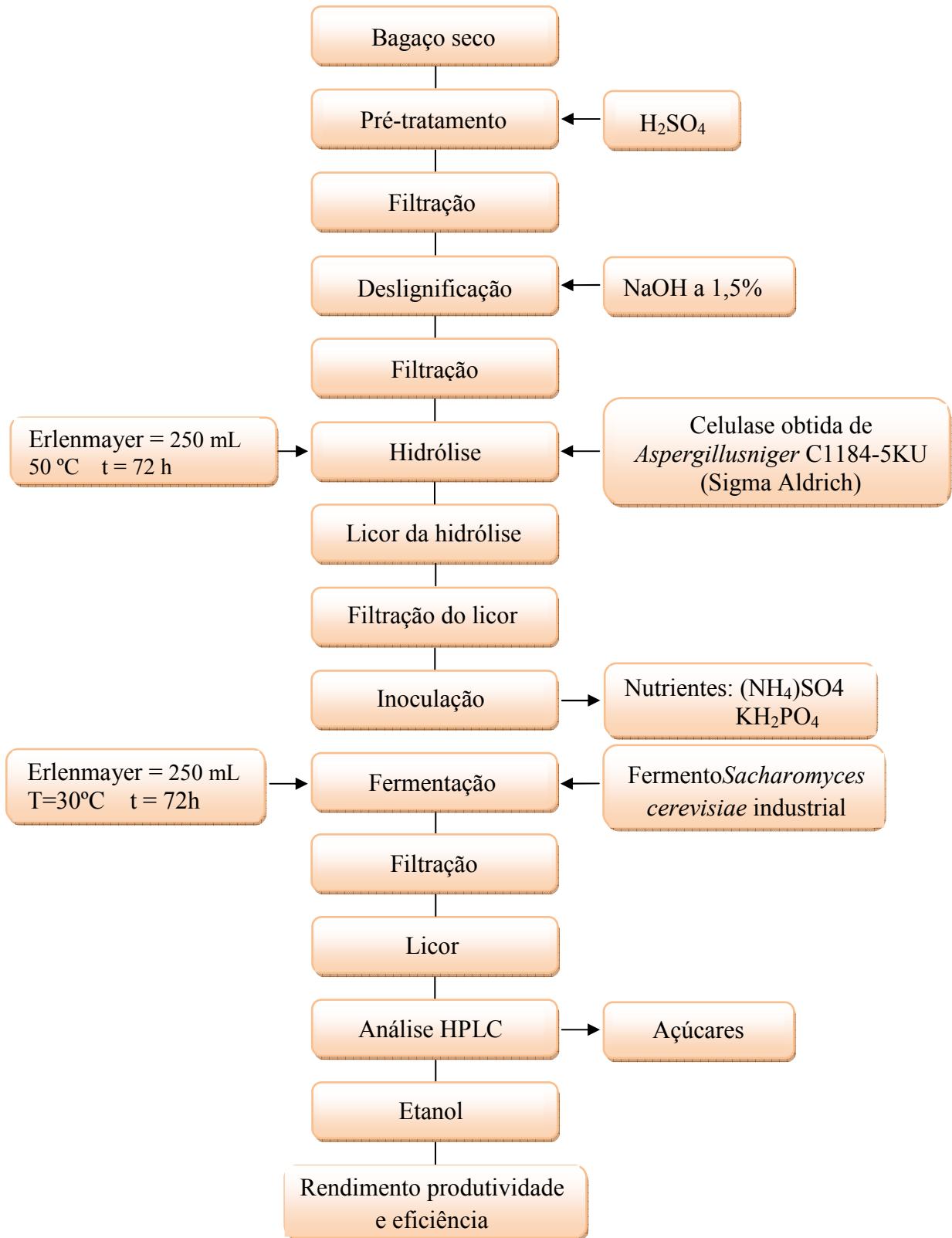


Figura 3.3. Fluxograma apresentando cada uma das etapas do processamento para obtenção do etanol

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo tem como objetivo apresentar e discutir os resultados experimentais da caracterização química do bagaço do pedúnculo do caju e da cana e a composição físico-química, dos prétratamentos, do estudo da hidrólise enzimática e o estudo da cinética da fermentação alcoólica do licor da hidrólise enzimática do bagaço do pedúnculo do caju para produção de bioetanol.

4.1. Caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju e da cana

Na Tabela 4.1 estão apresentadas as composições físico-químicas do bagaço do pedúnculo do caju e do bagaço de cana.

O percentual de celulose e ligninano bagaço de cana usada para o presente trabalho foi de 38 e 22%, respectivamente. Dados comparativos mostram valores similares indicando que o percentual de celulose é mais baixo em relação ao obtido na literatura, 37,35-25,10% e 42,8-22,1%, os quais utilizaram o bagaço de cana nos respectivos trabalhos (Moreira Neto et al., 2010; Gouveia et al., 2009).

Tabela 4.1.Caracterizações químicas do bagaço de caju e cana

Análises	Unidade	Bagaço de caju	Bagaço da cana
pH		4,76 ± 0,05	5,46 ± 0,05
Umidade	%	7,5 ± 0,20	3,08 ± 0,02
Celulose	%	34,93 ± 0,55	38,00 ± 0,02
Lignina	%	23,53 ± 0,37	22,00 ± 0,05
Extrativos	%	15,13 ± 0,005	4,48 ± 0,05
Sólidos solúveis	%	0,0	0,1

Alcântara et al. (2007) obtiveram, estudando a produção de pectinases utilizando do bagaço do caju, na caracterização físico-química do bagaço seco pH de 3,66, menor valor que o obtido neste estudo (4,76). No caso do bagaço de cana o pH encontrado por Raia et al. (2009) de 6,88%, foi superior ao deste trabalho. isto é, (5,46). Como se observa na Tabela 4.1 e comparando os bagaços de caju e cana, isto é, 7,5% e 3,08% respectivamente, para o teor de umidade constata-se haver mais umidade no bagaço do pedúnculo do caju que no bagaço de cana, cerca de 2,4 vezes. Dionísio et al. (2009) encontraram, trabalhando com a aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para a hidrólise de bagaço de cana de açúcar obtiveram pelo método da estufa até massa constante, uma umidade superior à do da cana encontrado neste trabalho com 8%, porém equivalente ao bagaço de caju.

Verifica-se que o teor de celulose encontrado para o bagaço do caju in natura, apresentado por Lima (2012) de 25,60%, é inferior ao encontrado neste trabalho (34,93%). Gouveia et al. (2009) encontraram, no bagaço de cana-de-açúcar sem prétratamento, valor superior ao deste estudo 42,8%.

O teor de extrativos do bagaço de caju determinado neste estudo, foi de 15,13%, valor este acima do resultado encontrado no bagaço da cana, o que foi de 4,48%, o que deve à característica do material pois o bagaço de caju apresenta mais compostos extrativos (ceras e taninos, entre outros) que o bagaço de cana. Moreira Neto et al. (2010), Silva et al. (2010) & Oliveira et al. (2010) encontraram estudando a caracterização do bagaço e da palha da cana, os teores de 3,2, 6,0 e 6,2% de extrativos, respectivamente.

De acordo com a Tabela 4.1, o teor de sólidos solúveis dos bagaços de caju e cana apresentou valores semelhantes, sendo 0,0 e 0,1 °Brix, respectivamente; as lavagens feitas nos resíduos do pedúnculo de caju e cana retiraram os sólidos solúveis.

Com a caracterização (Tabela 4.1) pode-se afirmar que o bagaço de caju é uma biomassa vegetal interessante para a produção de etanol celulósico, sendo semelhante ao bagaço de cana-de-açúcar.

4.2. Hidrólise enzimática

4.2.1. Planejamento experimental 2³ da hidrólise enzimática do bagaço do caju pré-tratado com ácidos e hidróxido de sódio

A Tabela I, apresentada no Apêndice A, mostra as concentrações de glicose do processo de hidrólise, na cinética de 48 e 72 h para diferentes atividades celulotícias, enquanto a Tabela 4.2 sinaliza a matriz de planejamento com os resultados da concentração de glicose para o tempo de 48 h.

4.2. Matriz de planejamento com a resposta concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática no licor hidrolisado do bagaço prétratado com ácido sulfúrico no tempo de 48 h

Experimento	% ácido	Tempo de prétratamento (min)	Celulase FPU	Glicose (mg/L)
1	-0,5	-15	-0,05	2475,57
2	+3,5	-15	-0,05	134,52
3	-0,5	+180	-0,05	1288,20
4	+3,5	+180	-0,05	182,52
5	-0,5	-15	+0,1	742,35
6	+3,5	-15	+0,1	1846,35
7	-0,5	+180	+0,1	1430,18
8	+3,5	+180	+0,1	259,47
9	2	97	0,075	223,63
10	2	97	0,075	173,39

Realizando-se uma regressão dos dados experimentais da resposta concentração de glicose no licor hidrolisado do bagaço do caju e se utilizando do ácido sulfúrico, obteve-se o modelo empírico apresentado na Equação 4.1, na qual estão os coeficientes estatisticamente significativos, com 90% de confiança – CG – Concentração de glicose)

$$CG(48\text{ h}) = 875,62 - 439,18 A - 254,80 T + 422,50 A.C - 438,76 A.T.C \quad (4.1)$$

A Figura 4.1 apresenta o diagrama de Pareto para o estudo da hidrólise enzimática do bagaço do caju utilizando-se do pré-tratamento com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, no tempo de 48 h.

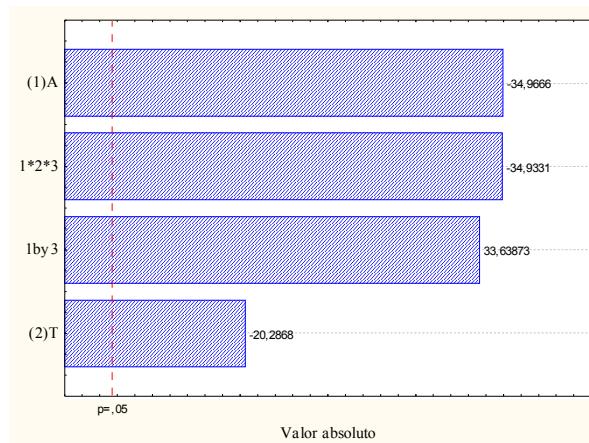


Figura 4.1. Diagrama de Pareto para a hidrólise enzimática do bagaço do caju-ácido sulfúrico (48 h)

Observa-se, na Figura 4.1, que os coeficientes estatisticamente significativos foram: concentração de ácido sulfúrico (A), interação das três variáveis (A.T.C), dupla interação das variáveis concentração de ácido e atividade enzimática (A.C) e a temperatura (T), em ordem de influência sobre a variável resposta concentração de glicose (mg/L) no licor hidrolisado. Os coeficientes concentração de atividade enzimática (C) e as interações concentração de ácido e temperatura (A.T) e temperatura e atividade enzimática (T.C) não foram estatisticamente significativos a nível de 90% de confiança.

A Tabela 4.3 apresenta a ANOVA para a resposta em estudo.

Tabela 4.3. Análise de variância da resposta concentração de glicose (48 h e ácido sulfúrico

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Quadrado médio	Teste F (Fcalculado/Ftabelado)
Ressão	5030576	4	1257644	1,38
Resíduo (erro)	1294576	5	258915,2	
Falta de ajuste	1293314	4		
Erro puro	1262	1		
Total	6325152	9		
R^2	80%			

O Fcalculado foi de 4,86 e o Ftabelado de 3,52, sendo a razão (teste F) acima de 1, fazendo com que o modelo empírico da regressão dos dados experimentais da resposta conc. de glicose (com ácido sulfúrico e 48 h de hidrólise) seja estatisticamente significativoa nível de 90% de confiança (Rodrigues& Iemma, 2009);desta forma, pode-se construir a superfície de resposta para avaliar as melhores regiões de operação do processo a fim de maximizar a resposta em estudo (Figura 4.2).

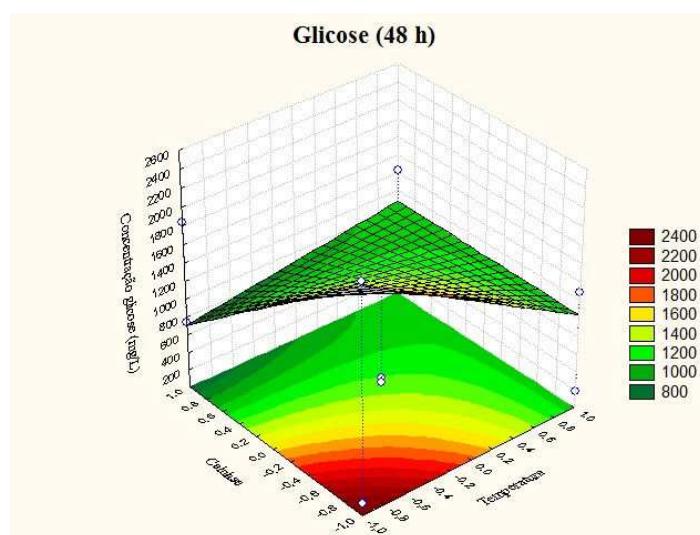


Figura 4.2. Superfície de resposta das influências das variáveis de entrada temperatura e atividade de celulase adicionada ao meio tendo a concentração de ácido

se mantido constante no nível -1, para a resposta concentração de glicose no licor hidrolisado no tempo de 48 h, utilizando-se de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio no pre-tratamento

Observou-se que a hidrólise enzimática resultou na liberação de glicose máxima acima de 2400 mg/L, quando se opera o processo nos níveis das variáveis de entrada do pre-tratamento, 15 min, concentração de ácido sulfúrico de 0,5% e 0,05 FPU de celulase e 48 h de hidrólise enzimática, na temperatura fixa de 130 °C; cujo estudo indicou que o processo obteve uma eficiência de liberação de glicose do bagaço, nas melhores condições, de apenas 5% do possível (41,92 g de glicose/g bagaço seco). Constatando-se que a variável mais influente é a concentração de ácido sulfúrico porém apenas no menor nível.

Silva et al. (2010) ressaltam no estudo do pre-tratamento ácido diluído da palha de cana-de-açúcar em reator piloto de hidrólise, que a avaliação da eficiência desta etapa pela conversão enzimática da fração resultante do pre-tratamento (celulignina) utilizando H₂SO₄ 1,0% a 120°C/10min, parte da celulignina foi submetida à deslignificação com NaOH a 1,0% a 100°C/1h. A conversão enzimática de 7,7 % para a palha de cana “in natura” chegou a 51,4% para o material pretratado e 85,0 % para o deslignificado utilizando-se uma carga de 15 FPU/g de lignocelulósico para o complexo Celluclast 1.5L na concentração de glicose de 55,1 g/L. Rocha et al. (2010) trabalharam com a hidrólise de cana-de-açúcar pretratado utilizando celulases de *Thichoderma harzianum* IOC 3844 e celulose microcristalina para compará-la com um preparado comercial (MUTIFECT). A hidrólise enzimática foi realizada com carga enzimática normalizada em 25 FPU/g e concentração de substrato de 40g/L, temperatura de 50°C, sob agitação de 200rpm/96h com uma concentração de glicose de 20g/L.

Observou-se neste trabalho, que a adição de celulase no processo de hidrólise foi muito baixa, motivo pelo qual foram realizados, após tal conclusão, estudos com maiores adições de atividade enzimática no processo de hidrólise enzimática (item 4.3), em busca de maiores liberações de glicose no licor hidrolisado.

Observando a Tabela I (apêndice A) verifica-se que no tempo de 72 h o processo de hidrólise enzimática apresentou menor concentração de glicose no meio reacional (licor), tanto para o pre-tratamento com ácido sulfúrico como com ácido fosfórico.

De acordo com os resultados obtidos, o pré-tratamento com ácido fosfórico, comparativamente ao ácido sulfúrico, também obteve a faixa de concentração de glicose máxima de 1099,12 mg/L (0,0087 g de glicose/ g de bagaço seco) obtida nas condições operacionais 0,5% ácido, 0,1 FPU de celulase e maior tempo de reação sendo que, para o pré-tratamento com ácido sulfúrico são necessários 15 min e para o ácido fosfórico, 180 min.

Considerando o estudo da influência da hidrólise enzimática nas condições de 48 e 72 h com os ácidos sulfúrico e fosfórico, seu uso leva à solubilização de parte da lignina mas a quantidade que sobra ainda prejudica a etapa de hidrólise, levando a baixos rendimentos. Para melhorar a susceptibilidade na hidrólise enzimática foi adicionada a etapa de deslignificação com hidróxido de sódio; o desempenho da hidrólise enzimática melhorou significativamente quando o bagaço pretratado com ácido sulfúrico apresentou bom rendimento na produção de glicose.

Observa-se nitidamente, pelos dados da Tabela I (Apêndice A), que o tempo de 48 h foi melhor para o processo de liberação de glicose no meio e que o ácido sulfúrico apresenta maior influência no processo final de hidrólise enzimática (pré-tratamento com ácido sulfúrico e posteriormente com hidróxido de sódio).

Alkasrawi et al. (2003) estudaram o efeito do pré-tratamento com ácido diluído e da deslignificação alcalina na remoção de hemicelulose e de lignina da palha de cana e obtiveram valores da celulose de 39% e da lignina de 22,5%. Para o presente trabalho não foram determinados o teor de lignina nem da hemicelulose após o tratamento com hidróxido de sódio e os ácidos sulfúrico e fosfórico, respectivamente, de vez que o pré-tratamento foi uma variável de entrada ao ser analisada no planejamento experimental.

Rueda et al. (2010) obtiveram, por meio de um pré-tratamento ácido com o bagaço da cana (0,5% de concentração de ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, 10% (m/v), 130°C e tempo de reação de 15min) uma concentração máxima de glicose de 414,9 mg de glicose/bagaço para o pré-tratamento com ácido sulfúrico e 404,5 mg/bagaço para o pré-tratamento com ácido fosfórico.

4.3.Aumento da adição da atividade enzimática da celulase

Buscou-se, após o estudo do item anterior, verificar a hidrólise enzimática do material lignocelulósico, bagaço do pedúnculo do caju prétratado, 0,5% de concentração de ácido sulfúrico, 10% (m/v), de bagaço, 130 °C, e tempo de reação de 15min elevando a atividade enzimática e aumentando a concentração de enzima no meio. A verificação da hidrólise enzimática ocorreu através da observação da liberação da glicose com o tempo no meio reacional (licor hidrolisado).

A Tabela 4.4 apresenta o acompanhamento das concentrações de glicose dos processos de hidrólises enzimáticas, nas condições de agitação de 150 rpm, temperatura de 50 °C em solução tampão ácido cítrico-citrato de sódio pH = 4,8 ± 0,2

Tabela 4.4.Concentração de glicose dos processos de hidrólises

Tempo (h)	Bagaço de caju	Bagaço de cana
	glicose mg/L	glicose mg/L
5,25 FPU de celulase		
12	18.540,59	19.653,79
24	20.200,82	17.565,29
48	22.283,81	18.104,84
72	25.103,95	22.201,02
7 FPU de celulase		
12	24.573,36	20.922,51
24	24.444,17	22.466,68
48	22.973,63	24.011,00
72	21.274,73	22.841,33

Constata-se, na Tabela 4.4, que para uma atividade enzimática de 5,25 FPU de celulase a quantidade de glicose produzida foi de 25103,95 mg/L do bagaço do caju e 22201,02 mg/L do bagaço de cana, no tempo de 72 h; a liberação máxima de glicose nessa hidrólise enzimática foi observada para o substrato bagaço de caju.

Com o aumento da adição de celulase para a atividade de 7 FPU, os melhores valores da concentração de glicose no meio reacional foram para o bagaço de caju, de 24573,36mg/L em 12 h de hidrólise e para o bagaço de cana de 24011,00 mg/L em 48 h de hidrólise. Rueda et al.(2010)estudaram a produção de glicose por hidrólise enzimática do bagaço de cana prétratado com dois ácidos diluídos e obtiveram o melhor resultado com o ácido sulfúrico com liberação máxima de glicose de 414,9 mg de glicose/g bagaço.

Com a avaliação do processo de conversão enzimática da celulase em açúcares fermentescíveis, o desempenho da hidrólise enzimática com 7 FPU apresentou, para o bagaço do caju no tempo de 12 h, uma concentração de glicose no licor hidrolisado comparado com o máximo possível (43,54 g/g celulose) de 56,13% enquanto para o bagaço de cana, 48,86% do máximo (49,14 g/g celulose) no tempo de 48h. Para aumentar a eficiência da hidrólise será necessário aumentar a adição de enzima, atividade enzimática que deverá ser acima de 7 FPU.

O material lignocelulósico do bagaço do pedúnculo de caju apresenta potencial promissor na obtenção de etanol celulósico; o bagaço da cana já é um material bastante estudado no Brasil e já comprovado o seu potencial na obtenção de bioetanol.

4.5.Cinética da fermentação

4.5.1. Estudo da cinética da fermentação alcoólica

Com o licor hidrolisado enzimaticamente, realizou-se o estudo da cinética de fermentação alcoólica.

A Figura 4.3 apresenta a cinética de consumo dos açúcares e da produção de etanol, nos experimentos dos 3 gráficos no ponto central do planejamento experimental, por meio da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* (cedida gentilmente pela GIASA), sendo o licor hidrolisado enzimaticamente suplementado com NH_4SO_4 sulfato de amônio e KH_2PO_4 fosfato de potássio; os perfis cinéticos da fermentação para os outros experimentos do planejamento experimental são mostrados no Apêndice B.

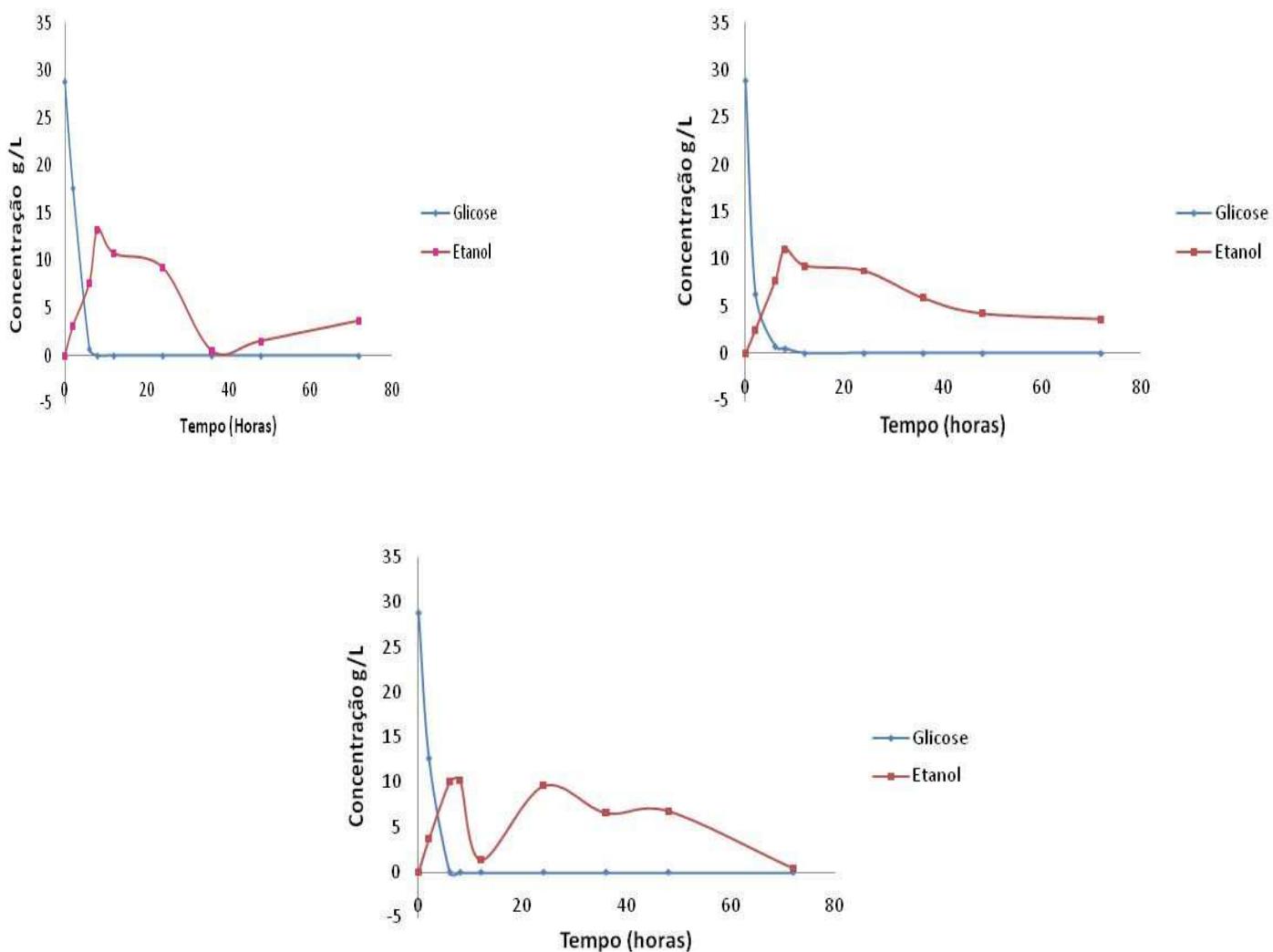


Figura 4.3. Perfil cinético do consumo da glicose para produção do etanol nos pontos centrais na $T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,8$, concentração de $\text{NH}_4\text{SO}_4 = 0,6 \text{ g/L}$ concentração de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,12 \text{ g/L}$ econcentração da levedura 10g/L

Figura 4.3a semelhança no comportamento dos perfis cinéticos, no que diz respeito ao consumo do açúcar, sinaliza que em aproximadamente 8 h de fermentação todo o açúcar foi consumido. Sousa et al. (2010) objetivaram a produção de etanol por fermentação do suco de cinco diferentes variedades de caju, identificada como clone 09 e clone 209. O micro-organismo utilizado foi a levedura *S. cerevisiae* comercialmente disponível, os experimentos foram realizados diretamente no suco não clarificado na temperatura de 20°C por 6 h. Durante o processo fermentativo acompanhou-se o consumo deglicose, a produção de etanol e o crescimento da biomassa, cujos os resultados obtidos

indicaram que o suco obtido do clone 209 apresentou uma produção maior de etanol (88,83g/L) e maior velocidade de crescimento celular, não consumindo toda a glicose presente no meio decultivo, mas apresentando menor velocidade de consumo de substrato.

No trabalho de Souza et al. (2010) o tempo de 5 h de fermentação foi suficiente em todos os experimentos para o máximo consumo de substrato. No presente trabalho verifica-se comportamento similar para o perfil cinético da concentração de etanol nos experimentos porém o tempo de fermentação foi de 8 h ocorrendo tendência de estabilização da produção de etanol devido ao esgotamento de substrato e à desaceleração do crescimento microbiano.

Silva (2010) obteve em estudo realizado com o objetivo de produzir bioetanol carburante empregando uma concepção de processo denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) a partir da celulose contida no resíduo oriundo do sistema de decantação da indústria de celulose e visando estabelecer condições que aumentassem a produtividade e a eficiência do processo, a máxima concentração de etanol quando o processo SSF foi conduzido em frascos agitados, 77,6 g/L, em 64 h, empregando *Saccharomyces cerevisiae* de panificação. Quando o autor utilizou um biorreator fermentando o hidrolisado por uma cepa industrial de *S. cerevisiae* codificada como JP1, o melhor resultado foi obtido da fermentação conduzida por 64 h, 74,6 g/L de etanol utilizando celulases comerciais (Multifect) e suplementando o hidrolisado enzimático com fontes de fosfato e nitrogênio e soluções de sais minerais e ácido cítrico.

A Tabela 4.5 apresenta a matriz de planejamento e os resultados dos parâmetros cinéticos ($Y_{p/s}$, % Conversão e produtividade volumétrica). De acordo com a metodologia descrita, realizou-se a cinética da fermentação com o licor hidrolisado enzimaticamente utilizando-se diferentes concentrações de levedura dos sais NH_4SO_4 e KH_2PO_4 (como fontes de N e P) para os respectivos experimentos. Obtendo-se, como resultado, os parâmetros cinéticos de rendimento teórico, percentual de conversão de etanol e produtividade no pico de maior concentração de etanol.

Tabela 4.5 Valores dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica do licor hidrolisado enzimaticamente

Experimento	Levedura (g/L)	(NH ₄)SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Y _{p/s (Pico)} (g/g)	Conv _(pico) (%)	Prod _(pico) (g/L h)
1	5	0,3	0,05	0,317	0,621	0,381
2	15	0,3	0,05	0,348	0,680	1,253
3	5	0,9	0,05	0,349	0,684	0,840
4	15	0,9	0,05	0,386	0,756	1,393
5	5	0,3	0,19	0,427	0,835	2,052
6	15	0,3	0,19	0,383	0,750	0,921
7	5	0,9	0,19	0,422	0,825	2,028
8	15	0,9	0,19	0,453	0,887	1,635
9	10	0,6	0,12	0,460	0,901	1,660
10	10	0,6	0,12	0,382	0,747	1,377
11	10	0,6	0,12	0,353	0,692	1,275

A análise dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento do substrato em etanol na condição de maior concentração de etanol representado pelo diagrama de Pareto encontra-se apresentada, na Figura 4.4.

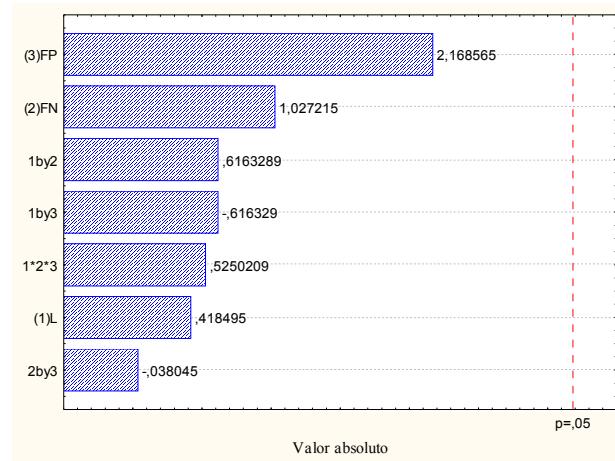


Figura 4.4. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento na fermentação da hidrólise enzimática do bagaço do caju

A análise dos efeitos das variáveis independentes sobre o % de conversão do substrato em etanol na condição de maior concentração de etanol, representado pelo diagrama de Pareto, está apresentada, na Figura 4.5.

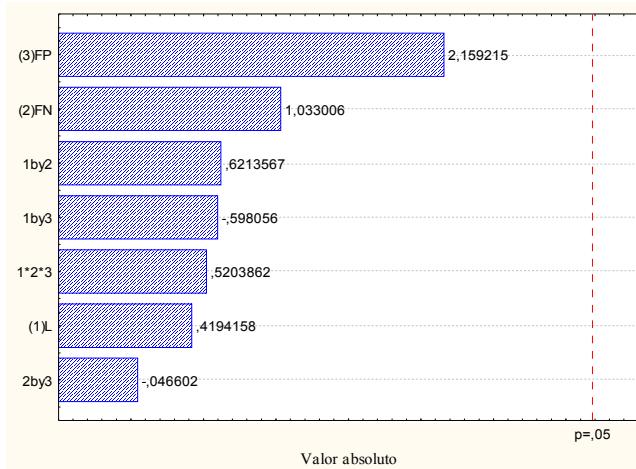


Figura 4.5. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre o % de conversão na fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço de caju

A análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a produtividade em etanol, na condição de maior concentração de etanol, representado pelo diagrama de Pareto, está apresentada, na Figura 4.6.

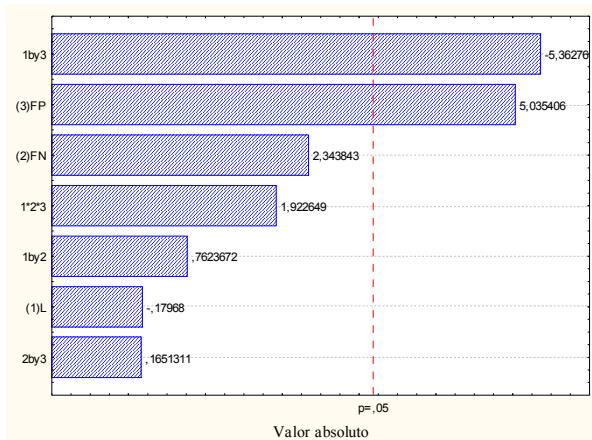


Figura 4.6. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis independentes sobre a produtividade na fermentação da hidrólise enzimática do bagaço de caju

Observando o diagrama de Pareto verifica-se que as variáveis de entrada rendimento teórico ($Y_{p/s}$) e % de conversão não apresentam influências estatisticamente

significativas a nível de 95% de confiança. Verificando-se, então, que com os níveis das variáveis estudadas na cinética de fermentação alcoólica, não houve influências nos parâmetros cinéticos estudados, ou seja, pode-se concluir que com os resultados da Tabela 4.4, pontualmente, por cada experimento, o experimento 8 apresentou resultado similar ao 9, não se verificando a resposta produtividade, sendo este último o que apresentou os melhores valores dos parâmetros cinéticos. Nos experimentos 8 (15g/L levedura, 0,9 g/L amônio e 0,19 de fósforo) e 9 (10g/L levedura, 0,6g/L de amônio e 0,12 g/L de fósforo), obtiveram-se 13 g/L de etanol porém nas condições do experimento 9 a quantidade de reagente e de levedura utilizados é menor indicando que o metabolismo da levedura já atingiu a eficiência máxima. Fica evidenciado, também, que todo o açúcar é consumido em 8 h e praticamente todo etanol é produzido em 8 h de processo.

Para a resposta produtividade os efeitos das variáveis são significativos, como mostra a Figura 4.6. Assim foi calculada a significância do modelo através da ANOVA e se verificou-se que o modelo é estatisticamente significativo a nível de 95% de confiança, pois o teste F está acima de 1 (Rodrigues & Iemma, 2009).

Tabela 4.6. Resultado da análise de variância ANOVA para a resposta produtividade

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Quadrado médio	Teste F (Fcalculado/Ftabelado)
Ressão	2,045209	2	1,023	
Resíduo (erro)	0,484934	8	0,061	
Total	2,530143	10		
R^2	80,1%			

Sendo o modelo da regressão dos dados experimentais da resposta produtividade da fermentação alcoólica do licor da hidrólise enzimática, pôde-se construir a superfície de resposta, Figura 4.7.

Observa-se, pela Figura 4.7, que fixando a fonte de fósforo no nível +1 (0,19 g/L) e a concentração de levedura no nível -1 (5 g/L), para qualquer valor de concentração da fonte de nitrogênio, obtém-se a produtividade em torno de 2 g/L h.

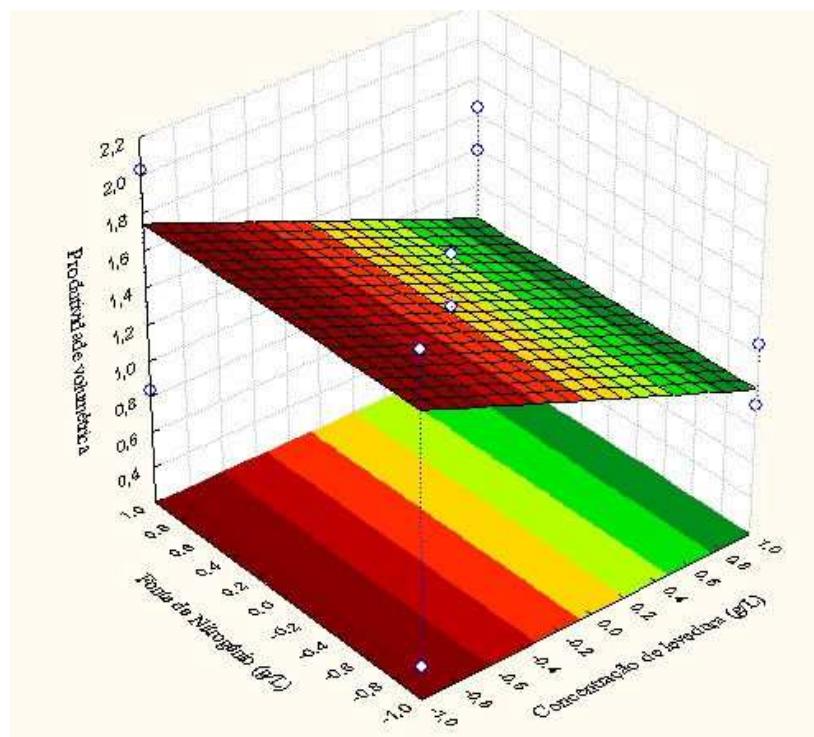


Figura 4.7. Superfície de resposta das influências das variáveis concentração de levedura e fonte de nitrogênio, fixando a fonte de fósforo no nível +1, para a resposta produtividade da fermentação alcoólica do licor da hidrólise enzimática

Analizando as 3 variáveis de entrada estudadas sobre a influência dos parâmetros cinéticos, concluiu-se que, para obter melhor eficiência da fermentação alcoólica tendo como função objetiva o máximo de % de conversão do açúcar em etanol, deve-se operar o processo fermentativo nos níveis de concentração de levedura no ponto central (10 g/L), fonte de nitrogênio (0,6 g/L) e fonte de fósforo (0,12 g/L), ou seja o experimento 9.

Lima et al. (2012) obtiveram, estudando a produção de bioetanol utilizando a hidrólise ácida na matéria-prima sisal, eficiência de fermentação alcoólica de 92% com a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae*. A hidrólise ácida do bagaço mais eficiente foi empregada nas condições de 3% de H₂SO₄ na temperatura de 160 °C na razão bagaço: ácido de 1:10, obtendo a liberação máxima de glicose no licor de 5,8 g/L; comparando com o presente trabalho, observa-se que a eficiência (% conversão) foi de 90% ou seja praticamente semelhante à do trabalho do sisal.

5. CONCLUSÕES

1. A composição do bagaço do caju usado neste trabalho apresenta-se como fonte promissora de celulose para a hidrólise enzimática, objetivando o bioetanol.

2. No estudo comparativo dos pre-tratamentos com os ácidos sulfúrico e fosfórico em função do tempo e da concentração, observou-se que o pre-tratamento com 0,5% de ácido sulfúrico no tempo de 15 min e a hidrólise do bagaço tratado em 48 h, obteve o maior rendimento de glicose, 2475,57 mg/L, do bagaço seco, operando-se com baixa atividade enzimática.

3. Com o aumento da carga de atividade enzimática, as melhores condições foram para a maior liberação da glicose do bagaço 7,0 FPU/g bagaço seco. O bagaço de caju teve melhor eficiência no tempo de 12 h, uma concentração de glicose no licor hidrolisado de (24573,36mg/L) enquanto para o bagaço de cana (24011,00 mg/L) no tempo de 48h.

4. No estudo da cinética de fermentação alcoólica conclui-se que para se obter melhor eficiência na fermentação alcoólica tendo como função objetiva o máximo de %conversão do açúcar em etanol, deve-se operar o processo fermentativo nos níveis de concentração de levedura no ponto central (10 g/L), fonte de nitrogênio (0,6 g/L) e fonte de fósforo (0,12g/L) com uma eficiência de 90%.

5. Para a resposta produtividade obtém-se valor máximo em torno de 2 g/L h.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. O estudo da hidrólise enzimática para maximização da eficiência do processo utilizando o bagaço do pedúnculo do caju seco.
2. Avaliação de características físicas, química e estruturais da lignina proveniente do bagaço de caju pré-tratado para que seja possível seu aproveitamento.
3. Outras formas de aproveitamento do resíduo (licor) do processo de pré-tratamento da hidrólise enzimática, como produção de xilitol.
4. O bagaço de caju poderá ser uma fonte alternativa de matéria-prima para produção de etanol lignocelulósico.

CAPÍTULO VI

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, R. S.; ALMEIDA, F. de A. C.; SILVA, F. L. H. da. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.9, n.2, p.137-142, 2007.

ALMEIDA, L. S. A inserção dos biocombustíveis na matriz energética brasileira à luz do princípio da precaução UFSC: Universidade de Santa Catarina, 2009. Monografia

ALVES, R. E. Colheita e conservação pós-colheita do pedúnculo e da castanha de caju. In: Silva, V. V. da. (Org). Caju: O produtor pergunta, a empresa responde. Brasília EMBRAPA-CNPAT, p.136-162, 1998.

ANP - Agência Nacional do Petróleo. Disponível em:
<<http://www.anp.gov.br/?pg=13660&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1275409373459>>. Acesso em: 01/07/2010.

ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira – FNP (Federação Nacional dos Portuários) Consultoria e Comercio, São Paulo, p, 360, 2009.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels, v.3, n.4.p.1-11, 2010.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acidcomposition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). Journal Food Composition, v.16, p.647-657, 2003.

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNEDLD, F.; ZACCHI, G.The effect of Tween-20 on simultaneous

saccharification and fermentation of softwood to ethanol. Enzyme and Microbial Technology, v.33, p.71-78, 2003.

AKINWALE, T. O. Cashew apple juice: Its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. European Food Research and Technology, v.211, p.205-207, 2000.

AZEVEDO, D. C. S.; RODRIGUES, A. S. M. B. Chromatography applied to the separation/purification of fructose from cashew apple juice. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.17, n.4-7, p.507-516, 2000.

BARCZA, M. V. Processos unitários orgânicos: Hidrólise. Disposto em: <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf>> Acesso em 27. out, 2010.

BIANCHI, M. L. Polpação de palha de milho utilizando diferentes processos organosolv. 76p. UNICAMP: Campinas. 1995. Dissertação Mestrado

BIASUTTI, E. A. R. Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: Utilização da subtilisina e da pancreatina. 88p. UFMG: Minas Gerais. 2006. Dissertação Mestrado.

BORBA, M. C. V.; GASPAR, N. F. Um futuro com energia sustentável: iluminando o caminho. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: FAPESP; [Amsterdam]: Inter Academy Council; [Rio de Janeiro]: Academia Brasileira de Ciências, 300p, 2010.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. FAO Symposium “The role of agricultural biotechnologies for production of bioenergy in developing countries”. Disponível em www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm. Acessado em 7 de abril de 2009.

BRASIL. Métodos físico-químicos para análises de alimentos/Ministério da Saúde, Instituto Adolfo Lutz (2005).

BRAGATTO, J. Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp para a produção de bioetanol. 154p. 2010. ESALQ/USP: Piracicaba. Tese Doutorado

CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo. Relatório final, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos CGEE-Nipe/Unicamp, dezembro de 2005.

CAMPOS, D. C.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. Desalination, v.148, p.61-65, 2002.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J.; Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. Bioresource Technology, v.98, p.2415- 2457, 2007.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. The fungi. 2.ed. London: Ed Elsevier Academic Press, 588p, 2002.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Science Technology, v.11, n.7, p.254-262, 2000.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós- colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio. 2º Edição, Lavras: UFLA, 785p, 2005.

CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010.

DIONÍSIO, G. F.; SANTANA, F. C. I.; MORAES, F. F. ZANIN, G. M. Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 8, Anais...COBEQ, Uberlândia Minas Gerais, Brasil, 2009. CD-Rom

DIVNE, C.; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSON, G.; KNOWLES, C. K. J.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. The three-

dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, v.265, p.524-528, 1994.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v.55, p.1-33, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Processamento da castanha de caju. Relatório de Atividades de Unidades de Pesquisa. 2007.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advanced Biochemistry Engineering*, v.23, p.158-187, 1982.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, A. P. S.; ISEPSOON, J. S.; BOLIANI, A. C.; TARSITANO, M. A. A.; AGUIAR, A. V.; BETTEGA, A. J. G. Efeito da quitosana na vida de prateleira do pseudofruto do cajueiro. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cabo Frio-RJ. Anais... Viçosa-MG: Jard Editora, p.506, 2006.

GADEN JÚNIOR, E. C. Fermentation process kinetics. *The Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v.1, p.413-429, 1959.

GHASSAN, T. A.; MOHAMAD I. A. L. WIDY, A. N. B.; ALI, O. A. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waster vegetable oil a water-cooled fumace. *Applied Thermal Engineering*.v.23, p.285-293, 2003.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advanced Biochemical Technology* (chapter in a book), Springer Verlag Berlim Heidelberg, n.108, p.41- 65, 2007.

GENOVESE, L. A.; UDAETA, M. M. E.; GALVÃO, R. C. L. Aspectos Energéticos da biomassa como recurso no Brasil e no mundo. <<http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?An.6>> Campinas, 2006.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; MAIOR A. M. S. Validação de metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, v.32 n.6, p.1500-1503, 2009.

GOMES, J. Os frutos sociais do caju, Fundação Banco do Brasil, Editora NT. Mendes, 2010.

GRAY, K. A.; ZHAO, L. Emptage, M. Bioethanol Current Opinion in Chemical Biology v.10, p.141-146, 2006.

HASSUANI, S. J. Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash/Suleiman José Hassuani, Manoel Regis Lima Verde Leal, Isaías de Carvalho Macedo – Piracicaba: PNUD-CTC, p.217, (Série Caminhos para Sustentabilidade), 2005.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility, of lignocellulosic biomass.Bioresouce Techonology, v.100 p.10-18, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em 14 jan. 2010.

INGRAM, L. O.; ALDRICH, H. C.; BORGES, A. C.; CAUSEY, T. B.; MARTINEZ, A.;MORALES, F.; SALEH, A.; UNDERWOOD, S. A.; YOMANO, L. P.; YORK, S. W.;ZALDIVAR, J.; ZHOU, S. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. Biotechnol Prog, v.15, n.5, p.855-666, 1999.

INOVAÇÃO UNICAMP. Brasil tem vantagem tecnológica em etanol, mas está em vias de perdê-la, diz Prêmio Nobel. Presidente da Embrapa concorda. 21.11.2005. III Conferência de Ciência, Tecnologia e Inovação, 21.11.2005. Disponível em <<http://www.inovacao.unicamp.br/report/news-IIIconferencia2.shtml>>. Acesso em: 15.8.2011.

KAMM, B.; KAMM, M.; GRUBER, P. (eds.). Biorefineries – Biobased industrial processes and products: status quo and future directions. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, v.2, n.31, 2009.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Bioethnology*, v.56 p.1-24, 1997.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Melhoria do Rendimento de Hidrólise enzimática para produção de Etanol a partir de farelo de mandioca. *Brazilian Journal Food Technology*, p.111-118, 1999.

LEMOS, J. L. S. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. UFRJ: Rio de Janeiro, 2011. Tese Doutorado

LIU, C.; WYMAN, C. E. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic. *Bioresouce Technology*, v.96 p.1978-1985, 2005.

LIMA, E. E. Estudo das cinéticas de hidrólise ácida e fermentação alcoólica do bagaço do pedúnculo de caju para produção do álcool etílico. 213p. 2012. UFCG: Campina Grande. Tese Doutorado

LIMA, C. S. S.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. L. H. da; [LIMA, E. E.](#) de; CONRADO, L. de S.; LEÃO D. A. S. Characterization of acid hydrolysis of sisal. *Applied Energy*, v.102, p.254-59, 2013.

LYND, L. R.; WEIMER, P. L.; ZYL, W. H. van; PRETORIUS, I. S. Microbial celulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v.66, n.3, p.506-577, 2002.

LLOYD, T. A.; WYMAN, C. E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*, v.96, p.1967-1977, 2005.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.69, p.1163-1169, 1992.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. 121p. UFPR: Curitiba. 2005. Dissertação Mestrado

MARTIN, C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L. J.A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. *Internacional sugar Journal*, Glamorgan, v.109, n.1267, p.33-39, 2007.

MEDVE, J.; SDHLBERG, J.; TJEMELD, F. Adsorption and synergisms of cellobiohydrolase from *Thichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology Bioengienirng*, v.44, p.1064-73, 1994.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. ALICE Web. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet Disponível em <aliceweb.desenvolvimento.gov.br> Acesso em: 14 jan. 2010.

MORTON, J. F.; DOWLING, C.; F. Fruits of warm climates. Creative Resources Systems, p.239-240, 1987.

MOREIRA NETO, J.; RIVEIRA, E. C.; MACIEL FILHO, R. e COSTA A. C. Modelagem e estimativa de parâmetros para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 8. Anais...COBEQ, p.1296-1304, 2010.

MOURA, C. A. H.; ALVES, R.E.; INNECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. R.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização in natura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, n.3. p.537-540, 2001.

NREL - National Renewable Energy Labotory. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples.Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2008.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J.; P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Journal of the American Oil Chemists' Society.Oregon Deparment of Energy.Overview of cellulose-ethanol productiontechnology,Oregon, 2002.

OLIVEIRA, V. H. D.; ANDRADE, A. P. S. Produção integrada de caju. Abrindo portas para a qualidade. Disponível em [http:// www. cnpat. Embrapa. br/pif/artigos/agroanalyse/index.html](http://www.cnpat.embrapa.br/pif/artigos/agroanalyse/index.html) Acesso em. abril 2007.

OLIVEIRA, F. M. V.;PINHEIRO, I. O.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Efeito do pré-tratamento com ácido diluído e da deslignificação alcalina na hidrólise enzimática de palha-de-cana visando obtenção de etanol In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 18. Anais...COBEQ, p.6842-6848, 2010.

OLIVEIRA, M. de; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial: Novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool. Revista FAPESP, v.122. 2011.

ODN - Oregon Deparment of Energy.Overview of cellulose-ethanol productiontechnology, Oregon, 2000.

OSTROWSKI, A. P.; VARGAS, F.; PIZZINATTO, L. E.; ARAÚJO, J. H. B. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. In: Mostra de iniciação científica e tecnológica interdisciplinar – IMCTI Camboriú, 16 e17 de outubro Colégio Agrícola de Camboriú, 2006.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. Aproveitamento industrial do caju. Fortaleza: Embrapa Agroindustria Tropical, 85p., 2000.

PAIVA, J. R. de; CAVALCANTI, J. J. V.; BARROS, L. M.; CRIS, J. R. Cajueiro anão precoce-clone BRS 226 ou planalto. 2010. Disponível em <http://www.cnpat.Embrapa.br/tecnologia.php?id=19>. Acesso em 16 out 2011.

PAVLAK, M. C. M.; ZUNINGA, D. A.; LIMA, A. T.; PINEDO, A. A.; CARREIRO, C. S.; FLEURY, C. C.; SILVA, L. D. Aproveitamento de farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignyna martiana*) para obtenção do etanol. Evidencia v.7, n.1, p.7-24, 2007.

PEARCE, R. J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. Australian JournalDairy Technology, v.50, n.1, p.15-23, 1995.

PEREIRA JÚNIOR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p.45, 2008.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. Química Nova, v.16, p.435-448, 1993.

PITARELO, A. N. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 109p. 2007. UFPR: Curitiba. Dissertação Mestrado

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de açúcar. 150p. 2007. UNICAMP: Campinas. Dissertação Mestrado

RAIA, K. S.; SILVA, F. L. H. da; OLIVEIRA, L. S. C. de; ALMEIDA, M. M. Estudo da produção de álcool etílico hidratado utilizando o suco do caju como substrato In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 8, Anais...Uberlândia Minas Gerais, 2009. CD-Rom

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *QuímicaNova*, v.26, p.863-871, 2003.

RAO, R. S.; JYOTHI, P. C. H.; PRAKASHAM, R.S.; SAMA, P. N.; VENKATESWAR, R. L. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, v.97, p.1974-1978, 2006.

ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; PEREIRA JÚNIOR, N. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando celulases de *Trichodermaharzianum* visando à produção de etanol de segunda geração In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 18. Anais...COBEQ, p.4100-4105, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão Editora, Campinas-SP, p. 326, 2009.

ROUVIEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, C. K. J.; JONES, T. A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichodermareesei*. *Science*, v.249, p.380-386, 1990.

RUEDA, S. M. G.; ANDRADE, R. R. de; SANTANDER, C. M. G.; COSTA, A. C.; M. FILHO, R. Pretreatment of sugarcane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugar production by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Transactions*, v.20, p.321-326, 2010.

SANTOS, A. M. Estudo das influencias da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. 77p.2008. UFAL: Maceió. Tese Doutorado

SESI - Serviço Social da Indústria. Os frutos sociais do caju: Receitas de caju. Brasília 2007.

SILVA, C. G. M. da. Processo biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C) em etanol). 2007. UFPE: Recife. Tese Doutorado

SILVA, L. B. de M.; CHAVES, B. P. J.; LELIS, G. V.; ALVARENGA, M. L. ZUIM, R. D.; SILVA, A. H. P. Qualidade físico-química e sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática. Revista Alimentos e Nutrição Araraquara, v.20 n.2 p. 217-221, 2009.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual de industria de celulose. 2010. UFRJ: Rio de Janeiro. Dissertação Mestrado

SILVA, V. F. N.; OLIVEIRA, F. M. V.; GONCALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Estudo do pré-tratamento ácido diluído da palha de cana-de-açúcar em escala piloto como etapa no processo de obtenção de etanol celulósico In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 18, Anais...COBEQ, p.6431-6440, 2010.

SOUZA, P. A.; SIMÕES, A. N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, F. V. Caracterização química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estágios de desenvolvimento In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém. Anais... SBCTA, p.158, 2002.

SOUZA, O.; SHULZ, M. A.; FISHER, G. A. A.; SOUZA, E. L.; SELLIN, N. Bioetanol de banana, polpa e cascas. In: Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2, Anais...SIGERA, 2010.

SHEEHAN, J. The road to bioethanol.A strategic perspective of the U.S Department of Energy's National Ethanol Program. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; SAFFLER, J. N.; Editors. Glicosyl hidrolases for biomass conversion, American Chemical Society, Washington D. C., p.2-25, 2001.

SHULZ, M. A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: Polpa e cascas da banana. 2010. UNIVILLE: Joinvile. Dissertação Mestrado

SANTOS, J. R. A. dos; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de açúcar, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.11, p.27-33, 2009.

SOUZA, P. A.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, V.S. Caracterização química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estádios de desenvolvimento In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 18, Anais... COBEQ/SBCTA, Belém, p.158, 2002.

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

SHARMA, N.; KALRA, K. L.; OBEROI, H. S.; BANSAL, S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, v.47, n.4, p.310-316, 2007.

SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos; In: SCHIMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. et al.; *Biotecnologia Industrial*, v.2, Engenharia Bioquímica; 1.^a ed; cap. 8, 2001.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Semina: Ciências Agrárias, v.25, p.315-330, 2004.

TAPPI – Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM). Atlanta: One Dunwoody Park, 2010.

TAVARES, I. B.; SANTANA, W. R.; SILVEIRA, M.A.; ALVIM, T. C. Produção de etanol utilizando como matéria-prima a batata-doce cultivada no Estado do Tocantins. In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, Anais... Teresina-PI, p.143, 2007.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function cellobio hydrolases. *Trends in Biotechnology*, v.15, p.160-167, 1997.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical principles of textile conservation. Butterworth Heinemann, Oxford. UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

MARIS, A. J. van; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; DIJKEN, J. P. van; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. Antonie Van Leeuwenhoek, v.90, n.4, p.391-418, 2006.

WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; HOLTZAPLE, M.; LADISCH, M.; LEE, Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies Bioresources Technology, v.96, p.1959-1966, 2005.

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

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. Biotechnology Bioengineering, v.102, p.1558-1569, 2009.

APÊNDICE A

Tabela I. Quantidade de glicose liberada após a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico e ácido fosfórico por 48 e 72 h de hidrólise enzimática.

			48 h de hidrólise enzimática				72 h de hidrólise enzimática			
Tempo de pré-tratamento (min)	% ácidos	FPU/g bagaço seco	Glicose (mg/L - H ₂ SO ₄)	Glicose (g de glicose/g de bagaço seco-H ₂ SO ₄)	Glicose (mg/L - H ₃ PO ₄)	Glicose (g de glicose/g de bagaço seco- H ₃ PO ₄)	Glicose (mg/L - H ₂ SO ₄)	Glicose (g de glicose/g de bagaço seco- H ₂ SO ₄)	Glicose (mg/L - H ₃ PO ₄)	Glicose (g de glicose/g de bagaço seco-H ₃ PO ₄)
15	0,5	0,05	2475,57	0,0201	138,86	0,0011	185,33	0,0014	408,94	0,0032
		0,1	742,35	0,0060	696,41	0,0056	1195,67	0,0095	735,58	0,0058
	3,5	0,05	134,52	0,0011	128,57	0,0010	1258,46	0,0099	405,50	0,0031
		0,1	1846,35	0,0150	352,67	0,0029	548,34	0,0043	527,83	0,0041
	2,0	0,075	223,63	0,0018	208,22	0,0017	181,53	0,0015	242,23	0,0019
		0,075	173,39	0,0014	140,34	0,0011	175,80	0,0013	198,56	0,0015
		0,075	108,64	0,0009	190,48	0,0015	71,39	0,0574	178,36	0,0014
97	0,5	0,05	1288,20	0,0104	424,19	0,0034	1284,65	0,0101	379,25	0,0030
		0,1	1430,18	0,0116	517,29	0,0042	2174,69	0,0017	1099,12	0,0087
	3,5	0,05	182,52	0,0015	295,25	0,0024	157,83	0,0012	126,61	0,0010
		0,1	259,47	0,0021	678,58	0,0021	337,25	0,0027	301,53	0,0023
180	0,5	0,05	1288,20	0,0104	424,19	0,0034	1284,65	0,0101	379,25	0,0030
		0,1	1430,18	0,0116	517,29	0,0042	2174,69	0,0017	1099,12	0,0087
	3,5	0,05	182,52	0,0015	295,25	0,0024	157,83	0,0012	126,61	0,0010
		0,1	259,47	0,0021	678,58	0,0021	337,25	0,0027	301,53	0,0023

APÊNDICE B

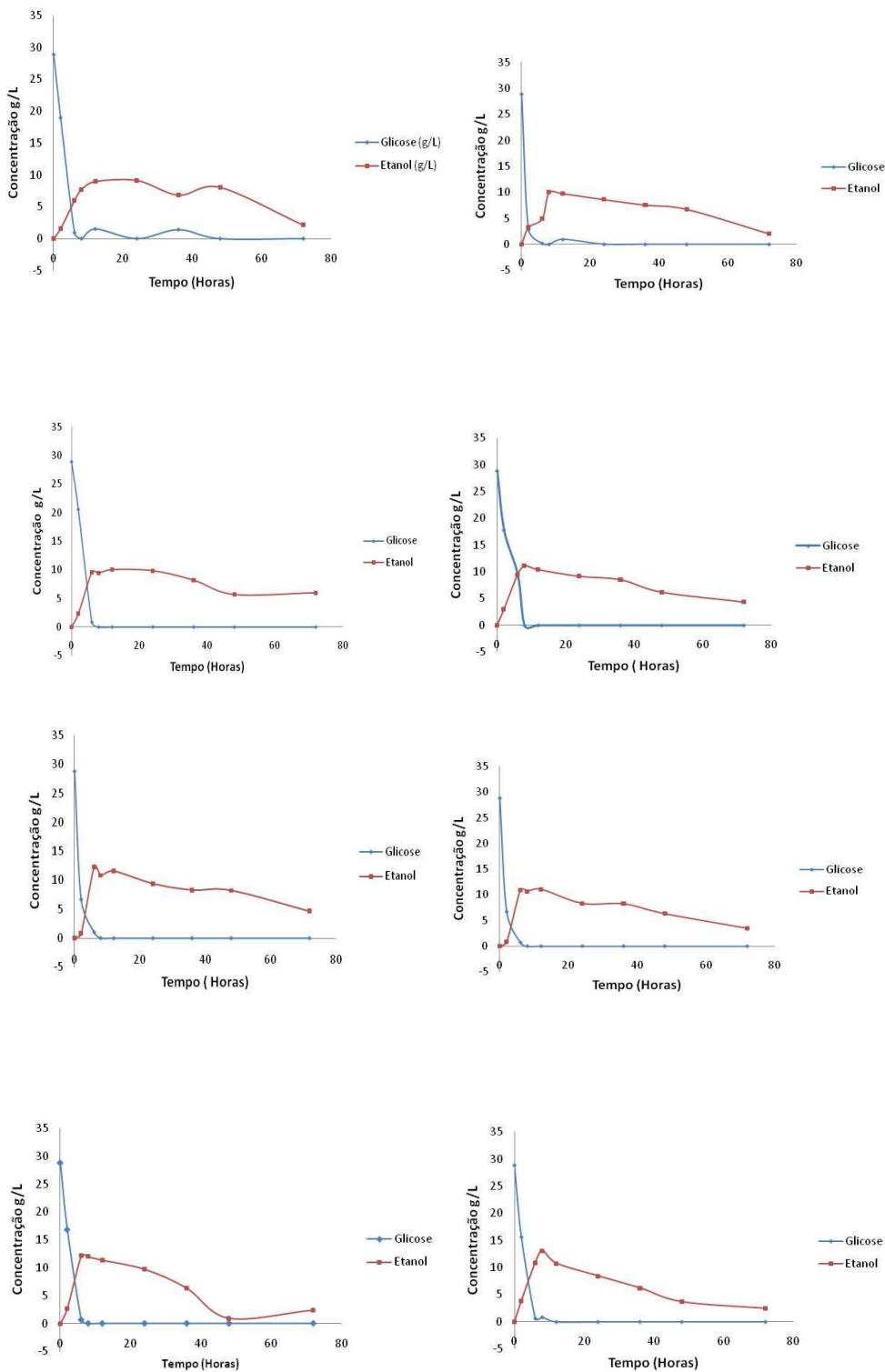


Figura 4.3. Perfil cinético do consumo da glicose para produção do etanol nos pontos centrais na $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,8$, concentração de $\text{NH}_4\text{SO}_4 = 0,6 \text{ g/L}$, concentração de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,12 \text{ g/L}$, concentração da levedura 10 g/L