

**UEA**

UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DO  
AMAZONAS

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**FLÁVIA DA SILVA FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO E ENZIMÁTICO PRODUZIDO A PARTIR DE  
RESÍDUOS VEGETAIS OBTIDOS EM FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**MANAUS  
2016**

**FLÁVIA DA SILVA FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO E ENZIMÁTICO PRODUZIDO A PARTIR DE  
RESÍDUOS VEGETAIS OBTIDOS EM FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

**Orientadora: Prof. Dra. Érica Simplício de Souza.**  
**Co-orientador: Prof. Dr. João Paulo Alves da Silva.**

**MANAUS  
2016**

**FLÁVIA DA SILVA FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO E ENZIMÁTICO PRODUZIDO A PARTIR DE  
RESÍDUOS VEGETAIS OBTIDOS EM FEIRAS ABERTAS DA CIDADE DE MANAUS  
PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof<sup>ª</sup>.Dra. Erica Simplício de Souza

Prof<sup>ª</sup>.Dra. Patrícia M. Albuquerque

Prof<sup>ª</sup>.Dra. Ormenzinda Celeste C. Fernandes

**MANAUS  
2016**



***Dedicatória***

*Á Deus, minha família e amigos tudo seria mais difícil sem o apoio e a compreensão de vocês.  
Obrigada!*

*Então, é isso.*

*Eu não me acostumei ainda com esse tempo que  
não para de passar.  
É difícil de encarar o mundo que me espera nessa  
outra estação...  
Que virá com seus segredos que alimentam meu  
desejo de lutar, mais uma vez, para merecer o  
brilho do sol...  
Mais um amanhecer.*

*Hugo Leone de Souza Araújo*

## AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus e a minha família: meus pais, Socorro e Flávio, pela educação que me foi dada, pela dedicação, pelo amor e pela confiança que sempre depositaram em mim. Vocês são minhas fontes de inspiração e forças. Ao meu namorado Hugo, pelo amor e compreensão. Ao meu irmão Flayson, por partilhar de sua vida comigo, pelo carinho e amizade. Obrigada por tornarem a minha vida mais feliz!

A minha orientadora, DSc. Érica Simplício de Souza pela paciência e confiança que sempre depositou em mim. Por sempre me fazer crescer a cada novo desafio.

Ao meu co-orientador DSc. João Paulo Alves, por ter aceitado a orientação de minha dissertação, pela disponibilidade e apoio.

Ao DSc. João Vicente Braga de Souza por ter me recebido em seu laboratório e me auxiliado todas as vezes que precisei, por seu exemplo, atenção e carinho. Manifesto meu agradecimento pela honra de trabalhar ao seu lado.

Às DSc. Patricia Albuquerque e Ormezinda Celeste C. Fernandes, e ao DSc. João Paulo Alves, por aceitarem compor as bancas de qualificação e de defesa, pelas sugestões e análises significativas.

Ao Laboratório de Microbiologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por ceder seu espaço para o desenvolvimento deste projeto. Ao Laboratório de Fermentação IV (USP-Lorena) pelas análises da composição de monômeros e inibidores. E a toda equipe que me auxiliou principalmente a Daiana Torres, a Isabela Ferreira e a Silviane Pinheiro.

Aos micomaníacos do Laboratório de Micologia do INPA (técnicos, IC's, mestrandos, doutorandos) pela companhia, ajudas oportunas, pela troca de experiências, pelos almoços, pelos trabalhos e pelas brincadeiras.

Meu agradecimento especial aos “meus” IC's Amanda Vasconcelos, Ralyvan Araújo e Sandryelle Plácido com quem tive o prazer de conviver neste projeto, eu não chegaria tão longe sem a ajuda de vocês, o amadurecimento e o amor á pesquisa em vocês me deixa orgulhosa.

Àquelas que caminham junto a mim na vida pessoal: Raquel Mousinho, Barbara Alves e Tatiane Mota, Drihelle Frazão. Obrigada pela amizade.

A Fapeam pelo apoio financeiro. Ao PPG – MBT/UEA, pela solicitude sempre que necessário. E todos aqueles que participaram e contribuíram de alguma forma na realização desta dissertação.

Muito obrigada!

## RESUMO

O elevado uso dos combustíveis fósseis tem aumentado o interesse em obter combustíveis renováveis e de baixo custo como o bioetanol. Resíduos vegetais lignocelulósicos podem ser hidrolisados e dar origem a açúcares fermentescíveis. O presente trabalho de mestrado objetivou investigar a utilização do hidrolisado ácido e enzimático produzido a partir de resíduos vegetais obtidos em feiras abertas da cidade de Manaus para produção de bioetanol. Na realização deste trabalho foram investigados os seguintes resíduos: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçú (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), palha do caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*). Esses foram submetidos à hidrólise ácida e à hidrólise enzimática. Posteriormente, foi realizada a caracterização de açúcares monômeros, furfural e hidroximetil-furfural de todos os hidrolisados e o mais adequado foi conduzido à fermentação e otimização da obtenção de açúcares. A fermentação dos hidrolisados foi realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 por 72 horas a 25 °C. Para a otimização da obtenção do hidrolisado ácido, foi realizado um delineamento experimental para avaliar a influência do tempo de hidrólise, razão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/de casca (g/g) e da razão sólido-líquido (g/g). Também foi realizado, a partir do delineamento experimental, a otimização do processo de obtenção do hidrolisado enzimático. O planejamento fatorial avaliou o desempenho da enzima Celluclast® 1.5 L em diferentes concentrações, tempo e temperatura. A caracterização dos hidrolisados ácidos e enzimáticos, mostrou que a casca de pupunha foi capaz de proporcionar bons níveis de glicose 56,55 g L<sup>-1</sup> e 23,5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Na etapa de fermentação, tanto o hidrolisado ácido (30 g/L) como o enzimático da pupunha (12,9g/L) produziram etanol. Para a máxima produção de açúcares e suportáveis teores de furanos, as concentrações ótimas para o hidrolisado ácido foram: Razão 0,63 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/de casca de pupunha (g/g) e Razão de 0,1707 sólido-líquido (g/g). Já para a produção de açúcares a partir do hidrolisado enzimático a enzima Celluclast® 1,5 L na concentração de 1223,4 U/g, 51,2 °C e 59,75 minutos de hidrólise apresentou o melhor desempenho, liberando 3,24 g/L de açúcares de casca de pupunha. Assim, pode-se observar o potencial de uso do hidrolisado ácido e enzimático da casca da pupunha como substrato para a produção de bioetanol.

**Palavras chaves:** substratos amiláceos, sacarificação, etanol

## ABSTRACT

The increased use of fossil fuels has enhanced the interest in obtaining renewable and low-cost fuels such as bioethanol. Lignocellulosic plant residues can be hydrolyzed and yield fermentable sugars. This master's project aimed to investigate the use of acid and enzymatic hydrolyzed produced from plant residues for bioethanol production obtained in an open market-place from Manaus city. For that reason, the following wastes were investigated: tucumã peel (*Astrocaryum aculeatum*), cupuaçu peel (*Theobroma grandiflorum*), peach palm peel (*Bactris gasipaes*), açai seed (*Euterpe oleracea*) and cassava peel (*Manihot esculenta*). Then, all these wastes were submitted to acid and enzymatic hydrolysis, after it was performed the characterization of monomers, furfural and hydroxymethyl-furfural of all hydrolyzed and the most suitable was conducted to fermentation and optimization of sugars obtainment. Fermentation process of hydrolysates was conducted with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2 for 72 hours at 25 ° C. In addition, for optimization of the acid hydrolyzed obtainment process, an experimental design was conducted to evaluate the influence of hydrolysis time, ratio g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / g of peel and the solid-liquid ratio required to obtain a hydrolyzate with higher concentrations of sugars and lower levels of furfural. Further, it was performed one experimental design, the optimization to obtain an enzymatic hydrolyzate process. The factorial design evaluated the performance of the enzyme Celluclast® 1.5L at different concentrations, time and temperature. As a result, the characterization of enzymatic and acid hydrolysates showed the peach palm peel has great glucose levels 56.55 g L<sup>-1</sup> and 23.5 g L<sup>-1</sup>, respectively. After the fermentation process, the peach palm acid hydrolyzate produced 29.2 g / L of ethanol theoretically and the peach palm enzymatic hydrolyzate produced 12,9 g / L. For maximal production of sugars and furans tolerable levels the optimal concentrations for the acid hydrolyzate were ratio of 0.63 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / g peel and solid-liquid ratio of 0.1707. However, for production of sugars from the enzymatic hydrolyzate the enzyme Celluclast® 1.5 L in the concentration of 1223.4 U / g, 51.2 ° C and 59.75 minutes of hydrolysis showed the outstanding performance releasing 3.24 g/L of sugars from peach palm peel. Thus, this study highlights the potential use of acid and enzymatic hydrolyzate of peach palm peel as substrate for the production of bioethanol.

**Keywords:** starchy substrates, saccharification, ethanol

## 1 LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 Níveis utilizados para determinar as concentrações de $H_2SO_4$ / casca (g/g), Sólido-líquido e o Tempo (min) observados no planejamento fatorial $2^3$ .....	33
Tabela 2 Concentração de monômeros, furfural e hidroximetil-furfural em hidrolisados ácidos de resíduos amazônicos. ....	37
Tabela 3 Concentração de monômeros, furfural e hidroximetil-furfural de resíduos amazônicos após destoxificação por carvão ativado. ....	37
Tabela 4 Influência do tempo de hidrólise e da razão $[H_2SO_4]/[casca\ de\ pupunha]$ / Razão Sólido-Líquido na concentração de AR do hidrolisado e furanos totais em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial $2^3$ + pontos centrais. ....	39
Tabela 5 Efeito das variáveis testadas para a produção de açúcares redutores e de furanos obtida, calculados a partir dos dados apresentados na Tab. 4 .....	39
Tabela 6 Análise de variância para a variável de resposta açúcares redutores em hidrolisados ácidos de casca de pupunha obtidos sob diferentes razões de $[H_2SO_4]/[casca\ de\ pupunha]$ , razões de Sólido-Líquido e tempos de hidrólise. ....	40
Tabela 7 Análise de variância para a variável de furanos em hidrolisados ácidos de casca de pupunha obidos sob diferentes razões de $[H_2SO_4] / [casca\ de\ pupunha]$ , razões de Sólido-Líquido e tempos de hidrólise. ....	40
Tabela 8 Parâmetros ideais para obtenção de hidrolisados de diversos resíduos agroindustriais, determinados por diferentes autores. ....	43

### CAPÍTULO II

Tabela 1 Níveis utilizados para determinar as concentrações de Celluclast® 1.5 L (U/g Casca), o tempo e a temperatura utilizados no planejamento fatorial $2^3$ .....	51
Tabela 2 Caracterização de açúcares redutores (AR) e glicose de hidrolisados ácidos de resíduos amazônicos após hidrólise utilizando as enzimas Celluclast® 1.5 L, $\alpha$ - glucosidase e Pectinex Ultra SP-L separadas e combinadas. ....	53
Tabela 3 Influência da concentração da enzima Celluclast®, do Tempo, e da Temperatura na concentração de AR do hidrolisado em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial $2^3$ + pontos centrais. ....	54
Tabela 4 Efeito das variáveis testadas para produção de açúcares redutores obtida, calculados a partir dos dados apresentados na Tabela 1. ....	55

Tabela 5 Análise de variância para a variável de resposta açúcares redutores em hidrolisados de casca de pupunha submetidos a diferentes concentrações de Celluclast 1.5 L , temperaturas e tempos de hidrólise. .... 55

Tabela 6 Parâmetros ideais para obtenção de hidrolisados enzimáticos de outros resíduos agroindustriais, determinados por diferentes autores. .... 57

## 2 LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido.....	18
Figura 2. Compostos gerados durante a hidrólise ácida de polissacarídeos e lignina, que interferem no processo fermentativo.....	19
Figura 3. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.....	20
Figura 4. Representação esquemática simples da via glicosídica e da fermentação.....	21
Figura 5. Açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> Mart.). A- Fruto. B - Semente do Açaí.....	23
Figura 6. Cupuaçú ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ).....	25
Figura 7. Macaxeira ( <i>Manihot esculenta</i> ).....	26
Figura 8. Pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> ). A – Pupunheira. B – Cacho de Pupunha.....	27
Figura 9. Tucumã ( <i>Astrocaryum aculeatum Meyer</i> ).....	28

### CAPÍTULO I

Figura 1. Concentração de açúcares redutores (g/L), produção de etanol teórico (g/L) e biomassa (g/L) durante a fermentação alcoólica do hidrolisado ácido de casca de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> ) (A) e da casca de macaxeira ( <i>Manihot esculenta</i> ) (B).....	38
Figura 2. Superfície de Resposta demonstrando o efeito da razão Sólido – Líquido e da razão gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /gcasca de pupunha na concentração de açúcares redutores (g/L) no hidrolisado ácido da casca de pupunha.....	41
Figura 3 Superfície de Resposta demonstrando o efeito da razão Sólido – Líquido e da razão gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /gcasca de pupunha na concentração de furanos (mg/L) no hidrolisado ácido da casca de pupunha. ....	41

### CAPÍTULO II

Figura 1. Concentração de açúcares redutores (g/L), produção de etanol teórico (g/L) e biomassa (g/L) durante a fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático de casca de pupunha ( <i>Bactris gasipaes</i> ).....	54
Figura 2 Influência dos fatores concentração da enzima (Celluclast® 1.5), temperatura e tempo na variável de resposta açúcares redutores obtidos a partir da hidrólise enzimática da casca da pupunha.....	56

### ANEXO

Figura 1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado da casca de pupunha.....	70
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 Necessidade de novas fontes de energia .....	14
2.1.1 Bioetanol.....	15
2.2 Produção de bioetanol por meio de resíduos agro-industriais.....	16
2.2.1 Fermentação de hidrolisados obtidos por via ácida .....	17
2.2.2 Fermentação de hidrolisados obtidos por via enzimática.....	17
2.2.3 Fatores Interferente na Hidrólise e na Fermentação de resíduos .....	21
2.3 Resíduos amazônicos .....	22
2.3.1 Carvão de Açai.....	22
2.3.2 Casca de cupuaçú .....	24
2.3.3 Casca de macaxeira .....	25
2.3.4 Casca de pupunha.....	26
2.3.5 Casca de tucumã.....	27
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>47</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>7 ANEXO .....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Há uma demanda mundial crescente para a produção de etanol por meio de bioprocessos. Isso ocorre porque as reservas de petróleo estão diminuindo e os preços dos combustíveis estão aumentando. Esses altos preços têm levado a crises de energia em países desenvolvidos e em desenvolvimento que dependem do petróleo. Os biocombustíveis continuarão a ser um alvo crítico de desenvolvimento de energia em muitas partes do mundo, se o preço do petróleo ultrapassar US\$ 55-60 por barril (RATTANACHOMSRI et al., 2009; ARAPOGLOU et al., 2010; AKPONAH; AKPOMIE, 2011).

Além do fator financeiro, há também a questão ambiental levantada em 1997 com as decisões do Protocolo de Quioto onde vários países do mundo decidiram buscar novas soluções para a redução das emissões de carbono e a utilização de fontes energéticas renováveis e limpas (KOHLHEPP, 2010; KIM; DALE, 2006). Os biocombustíveis são considerados fontes limpas porque são obtidos por meio das plantas, que realizam o processo de fotossíntese e absorvem dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) do ar, auxiliando na redução do efeito estufa e na compensação deste emitido durante o processo de combustão nos motores dos automóveis (PEREIRA, 2014). Com o consumo de etanol em veículos flex brasileiros, entre março de 2003 e janeiro de 2010, evitou-se a emissão de 83,5 milhões de toneladas (CO<sub>2</sub>) no ambiente. Estima-se que entre 2008/2017 a substituição da gasolina pelo etanol poderá evitar o lançamento de aproximadamente 508 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> (SZWARC, 2010; MMA, 2013).

Apesar das vantagens econômicas e ambientais do uso do etanol, nos próximos anos a produção do mesmo poderá ser insuficiente se for necessária à substituição dos combustíveis fósseis, em função do agravamento do aquecimento global ou da própria escassez de petróleo. Logo, seria importante a disponibilidade de combustíveis de segunda geração, ou seja, que aproveitem, por meio de tecnologias avançadas, a parcela da biomassa que não tem uso alternativo (ROSA; GARCIA, 2009).

Nas últimas décadas, vários processos biotecnológicos têm sido pesquisados para a produção de etanol de segunda geração, entre estes se destacam a hidrólise ácida e enzimática de biomassa. Essas tecnologias permitem a sacarificação de biomassa composta de celulose ou hemicelulose obtendo substrato passível de fermentação para obtenção de etanol. Alguns trabalhos têm sido realizados nesse sentido e tem apresentado bons resultados (AGU et al., 1997; EZEKIEL et al., 2012; NUWAMANYA et al., 2012). Assim como o processo de hidrólise, a fermentação de substratos amiláceos e celulósicos veem sendo aprimorada para realizar a conversão desses resíduos de forma mais rápida e barata, sendo um processo promissor que trará

aumento na produtividade de 40%-50% em relação ao processo tradicional de obtenção do etanol (KOHLHEPP, 2010; SALLA et al., 2010).

Todos esses fatores citados instigam a biotecnologia na fabricação de combustíveis renováveis, utilizando resíduos urbanos, industriais e agrícolas com o intuito de diminuir a poluição ambiental, criar produtos e processos alternativos associados à elaboração de etanol, e solucionar o aparente dilema combustível *versus* alimentos, enfrentado pela cana - de - açúcar, milho, beterraba entre outras fontes alimentícias utilizadas na produção de etanol de primeira geração (BARROS, 2011; NUNES et al., 2013).

Segundo Straus e Menezes (1993) citados por (Malheiros, 1996) a reutilização de resíduos trará grandes benefícios ao meio ambiente já que estes são produzidos em uma taxa mais elevada do que conseguem ser degradados. Desse modo, é necessário que existam mais formas para se reaproveitar esses resíduos, recuperando matéria e energia. Dentre os vários trabalhos encontrados na literatura com esse intuito, podem ser citados os trabalhos realizados com a casca da banana (SOUZA et al., 2012), casca de laranja(OBEROI et al., 2010a), casca de soja (MICHEL, 2007) e casca de macaxeira(NUWAMANYA et al., 2012).

Nas feiras de Manaus, podem ser encontradas toneladas de resíduos como casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), palha do caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*)(CLARICE MANHÃ, 2014). Todos esses resíduos são ricos em celulose e alguns deles ricos em amido. Entretanto, poucos estudos foram realizados para investigar o potencial desses substratos para produção do bioetanol.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Necessidade de novas fontes de energia

Há muito tempo, a matriz energética global advém da utilização de carbono fóssil, atingindo cerca de 80%, sendo 36% de petróleo, 23% de carvão mineral e 21% de gás natural (JARDINE; DISPATO; PERES, 2009). No entanto, faz-se necessária a rápida redução do seu consumo a partir da utilização de fontes de energia renováveis e de menor custo. Atualmente, as fontes energéticas oriundas de biomassas vêm substituindo gradualmente o petróleo, tornando-se assim, uma boa alternativa para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz na redução dos problemas ambientais (RAGAUSKA,2006; ARREDONDO,2009).

A partir da necessidade de recursos alternativos surgiram os biocombustíveis, combustíveis renováveis que podem ser produzidos a partir de diversas espécies vegetais, como a cana-de-açúcar; de biomassa florestal e de plantas oleaginosas - como a soja, o milho, a canola, o babaçu e a mamona. Havendo vários tipos de biocombustíveis como: bioetanol, biodiesel, biogás, biomassa, biometanol - estes os mais utilizados, bioéterdimetílico, bio-ETBE, bio-MTBE, biocombustíveis sintéticos e biohidrogênio (MMA, 2013).

O etanol foi a solução encontrada pelo governo brasileiro para liberta-se da dependência do petróleo em 1973, quando o preço do petróleo saltou de US\$2,91 para US\$12,45, um aumento de 428%, O Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi criado em 14 de novembro de 1975 visando o desenvolvimento de métodos e aprimoramento dos insumos para a produção de álcool etílico. Na primeira etapa os esforços concentraram - se na produção de álcool etílico anidro para ser acrescentado à gasolina e isso foi de 1975 a 1979. Os primeiros carros movidos totalmente a álcool etílico hidratado só começaram a circular em 1978 (BARROS, 2007).

O Proálcool evidenciou sua primeira fase crise no período 1986/1995. Nessa época, houve uma substancial redução da participação dos investimentos públicos no Programa e desequilíbrio entre a oferta e a demanda de álcool combustível, os preços do petróleo caíram, enquanto os preços do açúcar estavam em patamares elevados, sendo fatores importantes na explicação dessa fase crítica do Proálcool. A partir de então se constata uma segunda fase expansiva para o setor 2001 á 2009, crescimento médio de 12% ao ano. Para todo o período considerado (1975/76 a 2008/09), a taxa de crescimento médio anual da produção alcooleira do Brasil foi de 7,7%. Em 2011, o etanol e o bagaço de cana representaram perto de 16% da matriz energética brasileira. Além disso, após a introdução dos carros flex em 2003 o uso do álcool no Brasil tem crescido notadamente (SHIKIDA E PEROSA, 2012).

Atualmente, os biocombustíveis possuem tendência à expansão devido às mudanças climáticas, segurança energética, necessidade crescente de combustíveis e ausência de outras alternativas no curto prazo. Além de sua matéria-prima poder ser replantada diversas vezes e por emitirem uma menor quantidade de gases do efeito estufa. Além disso, auxiliam na redução da dependência exterior de petróleo, promovendo energia segura, e a redução do uso de gasolina e óleo diesel (ARREDONDO, 2009; TAYLOR, 2009), combustíveis que atualmente apresentam valores elevados para o consumidor quando comparados ao etanol tradicional.

O etanol de segunda geração ou bioetanol é produzido a partir de resíduos sendo uma metodologia muito interessante, por colaborar com a diminuição da quantidade de resíduos do meio ambiente, além disso, a geração de energia pode agregar valor à matriz produtiva da fruta reduzindo, assim, o risco de perdas provocadas por sua comercialização (SOUZA et al., 2012). Além de não causar a expansão de áreas rurais e a utilização de fontes alimentícias como matéria-prima para a geração de energia. Desse modo, a produção do bioetanol a partir de resíduos permite solucionar essas desvantagens causadas pelo uso do etanol no decorrer dos próximos anos.

### 2.1.1. Bioetanol

Na safra 2013/14 a produção de etanol atingiu 27,17 bilhões de litros sendo 12,02 bilhões de litros de etanol anidro e 15,16 bilhões de litros de etanol hidratado (CONAB, 2014). Esse combustível é produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar, e nos Estados Unidos a partir do milho, que juntos correspondem a 72 % da produção mundial (UNICA, 2008).

O bioetanol, ou etanol de segunda geração, é obtido por meio da fermentação de resíduos vegetais, passando por um processo físico-químico até se transformar em combustível podendo ser obtido a partir de qualquer biomassa que tenha quantidades significativas de carboidratos, particularmente amido ou açúcares. Em escala industrial o processamento do amido, por exemplo, se inicia com a separação, a limpeza e a moagem da matéria-prima. A moagem pode ser úmida, quando a matéria-prima é umedecida e, em seguida fracionada, ou seca, que é método que tem se definido mais recentemente. Em ambos os casos, a fragmentação permite que os amidos contidos nesta matriz vegetal sejam convertidos em açúcares por meio de processo enzimático. Os açúcares liberados são, então, fermentados por leveduras e o vinho resultante, tal

como o que ocorre com a cana de açúcar, é destilado para a purificação do bioetanol (JARDINE; DISPATO; PERES, 2009).

A aplicação do bioetanol é variada, podendo ser empregado em misturas com gasolina, como reagente para produção de biodiesel ou uso direto como combustível. Pode ainda ser aplicado em produtos químicos, explosivos, perfumes ou tintas. O CO<sub>2</sub> liberado na queima do bioetanol conserva-se dentro de um "ciclo fechado", pois foi removido da atmosfera pela fotossíntese durante o desenvolvimento das plantas, as quais fazem parte da biomassa (LAMTEC, 2009). O bioetanol, portanto, é uma alternativa eficaz contra os desfavoráveis fatores financeiros e ambientais causados pelo uso dos combustíveis fósseis. É um avanço em relação ao etanol de primeira geração, pois não são utilizadas fontes alimentícias e sim resíduos agroindustriais para a produção desse biocombustível.

## 2.2 Produção de bioetanol por meio de resíduos agro-industriais

A produção do bioetanol a partir de resíduos é de extremo interesse para o Brasil, visto que seu território possui grande biodiversidade, o que gera uma variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, sem reutilização econômica. Segundo BALAT e colaboradores, 2008 para a produção de bioetanol, as matérias-primas podem ser classificadas em três tipos: sacarificadas (cana de açúcar, sorgo doce, beterraba), amiláceas (milho, batatas, cereal, mandioca), e celulósicas (madeira, palha). O etanol de segunda geração ou bioetanol vem sendo produzido pela hidrólise de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nas últimas duas décadas essa tecnologia tem sido discutida para atender o mercado de combustíveis. Os principais estudos científicos e de desenvolvimento são realizados nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todo o mundo, utilizando a elevada disponibilidade de resíduos orgânicos de várias fontes (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

Os rejeitos e os resíduos agrícolas vêm recebendo atenção nas últimas décadas por serem uma biomassa com alto potencial, sobretudo em função da sua abundância e do caráter renovável. Praticamente todos os resíduos de biomassa, descartados nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, exibem altos teores de materiais lignocelulósicos. Esses

materiais são compostos, basicamente, por 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 25% de lignina (MOREIRA, 2005; MACEDO;SEABRA; SILVA, 2008;).

Na fermentação, utilizam-se principalmente produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, milho, trigo, mandioca, entre outros (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). No entanto, tem-se promovido o uso de resíduos agroindustriais para a produção de baixo custo do bioetanol. Dentre os vários trabalhos encontrados na literatura podem ser citados os trabalhos realizados com a casca da banana (SOUZA et al., 2012), casca de laranja (OBEROI et al., 2010a), casca de soja (MICHEL, 2007), casca de mandioca (NUWAMANYA et al., 2012) e casca de arroz (HICKERT, 2010).

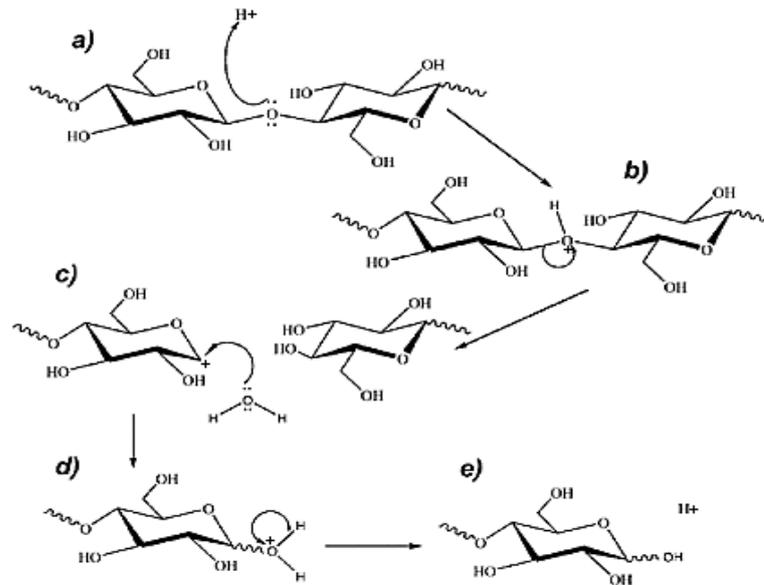
O processo de produção de etanol a partir de resíduos ocorre da seguinte forma: primeiramente, converte-se o amido, a celulose e a hemicelulose em açúcares menores, por meio de hidrólise ácida ou enzimática; em seguida, é realizada a fermentação transformando esses açúcares em etanol(FULTON; HOWES, 2004). A partir da reutilização de matérias-primas agrícolas surgem novas fontes de amido, celulose e hemicelulose com propriedades industrialmente interessantes, suscitando cada vez mais o interesse industrial nessa área (FERREIRA et al., 2013).

### 2.2.1 Fermentação de hidrolisados obtidos por via ácida

A hidrólise ou sacarificação é uma reação química em meio aquoso, em que ocorre a quebra de uma molécula pela água, em seguida um hidrogênio da molécula de água é transferido para um dos produtos e o grupo OH é transferido para o outro produto (MANO e SEABRA, 1969).

A hidrólise da biomassa celulósica realiza a transformação desta em açúcares fermentescíveis, sendo que as rotas mais utilizadas para a despolimerização de substratos têm sido os processos biológicos (hidrólise enzimática) e os processos químicos (hidrólise ácida) para a quebra das cadeias de amido, celulose, hemiceluloses em moléculas menores como hexoses e pentoses, que possam ser utilizadas na fermentação (Figura 1). Após a hidrólise, é realizada a produção de etanol por meio de processos fermentativos alcoólicos convencionais(BASTOS, 2007; DWIVEDI; ALAVALAPATI; LAL, 2009; BALAT, 2011).

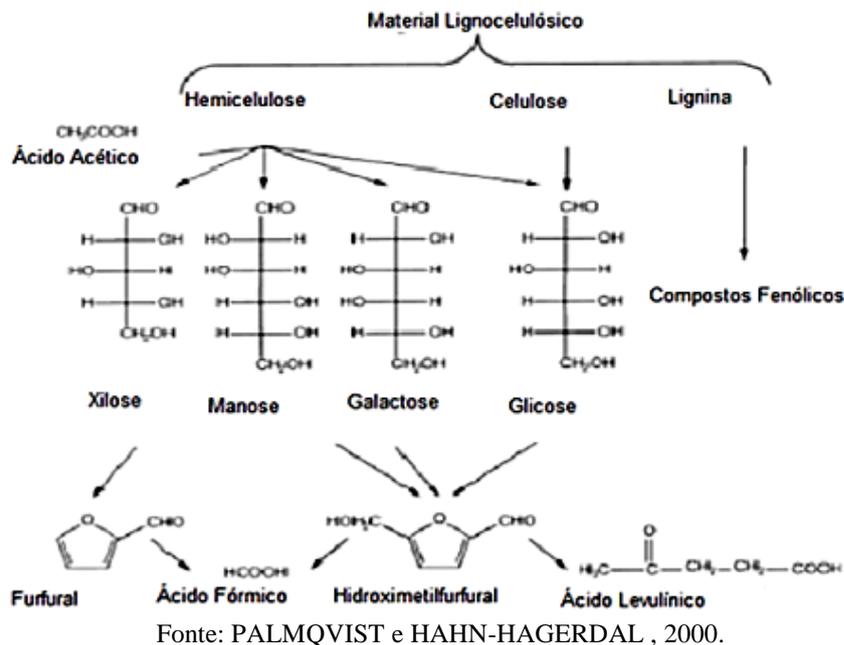
**Figura 1.** Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido. A hidrólise ácida inicia com a protonação do oxigênio glicosídico (Figura 1a) com posterior quebra da ligação C1 – O. O carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C1. O ataque nucleofílico da água sobre C1 (Figura 1c) com regeneração do ácido (Figura 1d e 1e) encerra a etapa de despolimerização (se esta ocorrer no interior da cadeia da celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais).



Fonte: DANIEL, 1994.

O uso de ácidos para hidrolisar a biomassa é relativamente antigo, considerando-se que sua utilização data do fim do século XIX, sendo considerado antieconômico na época, hoje em dia, essa metodologia é empregada pela empresa brasileira DEDINI, que desenvolve um projeto para produção de bioetanol a partir do bagaço de cana. (ROSA; GARCIA, 2009). A hidrólise ácida é um processo mais rápido do que a hidrólise enzimática. No entanto, segundo Machado, 2007 esse processo tem como desvantagens a necessidade de neutralização e a corrosão nos equipamentos provocada pelo uso contínuo do ácido, além da formação de inibidores fermentativos como o furfural e o hidroximetilfurfural (Figura 2).

**Figura 2.** Compostos gerados durante a hidrólise ácida de polissacarídeos e lignina, que interferem no processo fermentativo.



Na hidrólise ácida são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, como o furfural e as hexoses geradas na degradação de parte das hemiceluloses e celulose, como por exemplo, a glicose e a xilose. A maioria dos microrganismos utilizados nos processo de fermentação alcoólica são apenas capazes de converter hexoses em etanol, sendo as pentoses consideradas inibidores da fermentação. Nessa hidrólise o ácido mais empregado é o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído (0,7-3,0%), porém, o ácido nítrico, o ácido clorídrico e o ácido fosfórico estão sendo analisados. Essa metodologia se mostra eficaz em diversas biomassas, como madeira, gramíneas e resíduos agrícolas (BALAT et al, 2008; PIETROBON, 2008).

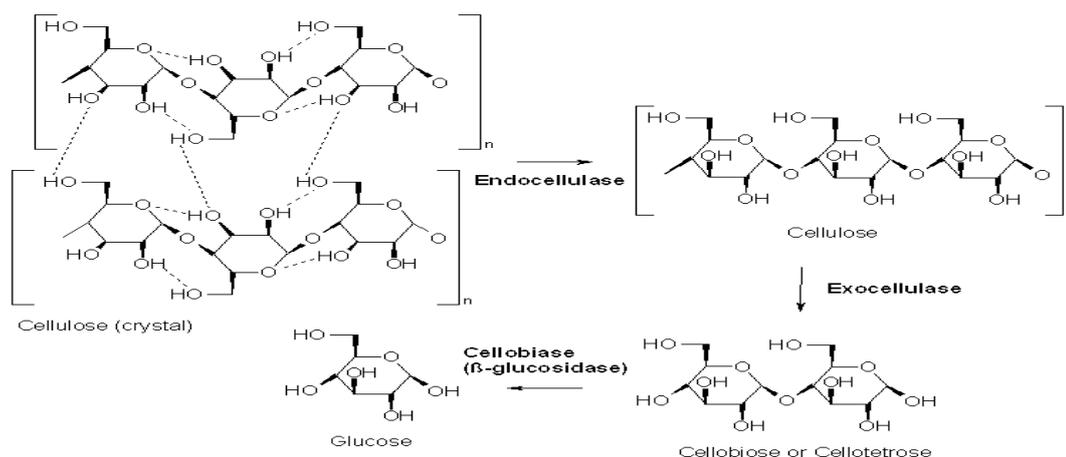
### 2.2.2 Fermentação de hidrolisados obtidos por via enzimática

Há muito tempo é realizada a hidrólise enzimática do amido a partir do uso dos catalisadores biológicos (enzimas) para a produção de etanol. Entretanto, esse processo envolve a quebra de polímeros mais resistentes e que estão protegidos por outros materiais resistentes ao ataque químico, como a lignina e a hemicelulose (ROSA; GARCIA, 2009). Nesse tipo de sacarificação podem ser utilizadas enzimas de origem microbiana ou vegetal. Os mais conhecidos são o malte, o farelo enzimático e as enzimas comerciais obtidas de microrganismos.

No entanto, um fator limitante ao uso de enzimas é o dispendioso valor das mesmas.(SURMELY et al., 1997; VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

Na hidrólise enzimática, o amido entra em contato com as amilases que atuam convertendo essa molécula em oligossacarídeos, alterando as propriedades da solução que o contém até a formação de amilose, dextrina, maltotriose, maltose e glicose (PEIXOTO; ALMEIDA; FILHO, 2013). Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente (Figura 3). E estão subdivididas em três classes: endo-1,4- $\beta$ -Dglucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- $\beta$ -Dglucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- $\beta$ -D-glucosidades que hidrolisam a celobiose à glicose (OLSSON et.al., 2004).

**Figura 3.** Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.

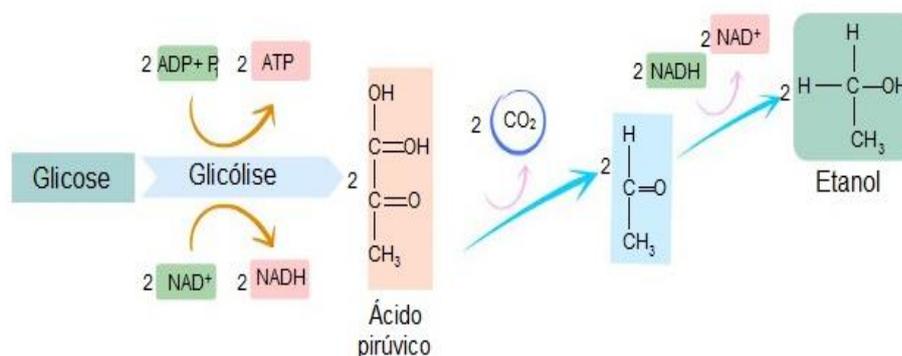


Fonte: Adaptada de Worthington Biochemical Corporation, 2016.

Os açúcares fermentescíveis, gerados após a hidrólise, precisam ser metabolizados por um microorganismo para a produção do bioetanol. A fermentação alcoólica ocorre no citoplasma da célula, onde se localizam estas enzimas, denominadas de enzimas glicolíticas. O processo se inicia por meio da atuação da exoenzima invertase, a qual, por meio da hidrólise, transforma o açúcar (sacarose) em glicose e frutose (monossacarídeos estruturais). Esses monossacarídeos serão absorvidos pela célula da levedura (aeróbio facultativo), que em condições de aerobiose serão utilizados no processo de respiração da mesma (AMORIM et al., 1996) e em condições de anaerobiose realizará a fermentação, transformação que envolve uma sequência de 12 reações, sendo estas catalisadas por enzimas (LIMA et al., 2002). A levedura mais conhecida para fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui um amplo espectro de

utilização, sendo utilizada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol e etc. (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003). Várias substâncias são produzidas a partir da fermentação alcoólica, além do etanol e do  $\text{CO}_2$ , entre elas podemos citar o glicerol, os ácidos orgânicos, os álcoois superiores, o acetaldeído, a acetoina e o butilenoglicol (DE SOUSA; MONTEIRO, 2011).

**Figura 4.** Representação esquemática simples da via glicocídica e da fermentação.



Fonte: mundoeducacao.com

### 2.2.3 Fatores interferentes na Hidrólise e Fermentação de resíduos

Alguns fatores podem interferir na fermentação alcoólica como o pH, agitação (aeração), temperatura x tempo, nutrientes e substrato, contaminantes bacterianos e o etanol. O pH, por exemplo, deve permanecer entre 4,5 a 5,0 evitando assim o crescimento de bactérias. Essa contaminação bacteriana pode afetar o desenvolvimento das leveduras causando perda no rendimento do processo fermentativo e da qualidade do produto. A aeração e a agitação devem ser evitadas durante a fermentação já que na presença de oxigênio pode ocorrer a formação de ácido acético. No entanto, no início da fermentação, a aeração e a agitação podem ser utilizadas para maximizar a propagação das leveduras (DE SOUSA; MONTEIRO, 2011).

A temperatura durante a fermentação deve variar em torno de  $25^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$ , e o etanol deve estar presente em quantidade inferior a  $8^\circ\text{Gl}$ , pois em quantidades superiores pode inibir o desenvolvimento da levedura pela sua desnaturação. Os nutrientes também podem inibir o crescimento das leveduras quando estão presentes em concentrações elevadas (DE SOUSA; MONTEIRO, 2011). As leveduras necessitam de fonte de carbono que forneça energia, sendo esta fonte a glicose ou outro açúcar. O meio deve ser fonte de algumas vitaminas, nitrogênio, ferro, cobre, enxofre, fósforo, entre outros. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de se beneficiar com as proteínas do meio. E não possui capacidade metabólica de aproveitar o

nitrogênio em forma de nitrato, somente na forma amoniacal, amídica ou amínica (LIMA et al., 2002).

Para a otimização da hidrólise a partir de resíduos são realizadas combinações variadas de diversos fatores importantes na sacarificação. Na hidrólise ácida são observadas a concentração do resíduo, temperatura, pH, tempo de reação e concentração do ácido. Já na hidrólise enzimática são analisadas diferentes concentrações do resíduo, temperatura, pH, tempo de reação e concentração das enzimas, como pode ser observado nos seguintes trabalhos com: casca de arroz(HICKERT, 2010), bagaço de cana (LORENCINI, 2013) e casca de banana (SOUZA et al., 2012).

### 2.3 Resíduos amazônicos

Atualmente, existe no mercado uma grande variedade de produtos de frutas originárias da região Norte, que possuem além do papel nutricional, outros fatores que podem beneficiar a sociedade. Há poucas informações sobre essas frutas exóticas, que estão ganhando espaço nos mercados brasileiros e mundiais, o que acaba por despertar o interesse por parte dos pesquisadores a respeito do seu potencial biotecnológico (MATIAS; SANTOS, 2007). Tem sido observado que os resíduos são uma fonte potencial para a produção de produtos químicos tais como etanol, açúcares redutores e furfural, utilizando enzimas ou hidrólise catalisada por ácido (DEMİRBAŞ, 2005). A utilização desses substratos agroindustriais e florestais para a produção de combustíveis renováveis soluciona o problema ambiental de acúmulo de resíduos, evitando contaminação do meio ambiente (ROSA et al., 2011).

Conforme dados da Secretaria Municipal de Limpeza (Semulsp) diariamente são recolhidas 95,4 toneladas de alimentos nas lixeiras, em 39 feiras e mercados. O total de alimentos desperdiçados chega a somar 2862 toneladas em um mês. Grande parte do material descartado nas feiras é orgânico, sendo que restos de frutas e legumes não podem ser vendidos e são impróprios para o consumo. Vários resíduos amazônicos ricos em amido e celulose são encontrados nas feiras de Manaus como a: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), palha da semente de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*)(CLARICE MANHÃ, 2014).

#### 2.3.1 Palha da Semente de Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma planta comumente observada na Amazônia Brasileira em terrenos de várzea, igapós e terra firme nos estados do Amapá, Maranhão, Pará,

Tocantins e Mato Grosso, além de Venezuela, Colômbia, Guiana e Suriname(CAVALCANTE, 1991).A palmeira *Euterpe oleracea* (Mart.) tem mostrado grande potencial mercadológico nos seus produtos, representados, principalmente, pelo palmito e pelo suco extraído do açaí (NASCIMENTO; CICERO; NOVEMBRE, 2010).

O açaí é considerado um alimento altamente nutritivo, sendo rico em fibras e minerais como o manganês, cobre, boro e cromo e de alto teor lipídico (ROGEZ, 2000).Possui também  $1,52 \pm 0,68\%$  de açúcares totais,  $1,23 \pm 0,10 \%$  de açúcares redutores,  $0,28 \pm 0,05 \%$  de açúcares não redutores, $11,49 \pm 0,15 \%$  de sólidos totais,  $2,50 \pm 0,05$  (°Brix) de Sólidos solúveis,  $0,12 \pm 0,01$  (g/100g) de acidez total e  $5,05 \pm 0,00$  de pH (OLIVEIRA; SANTOS, 2011).

A região norte se destaca na produção nacional de Açaí com 92,2% da produção. Em 2008 a produção brasileira do fruto foi de quase 121 toneladas, equivalente a R\$ 133,7 milhões (RODRIGUES, 2010). Dados do IBGE em 2010 revelam que o Brasil produziu, em 2009, aproximadamente 119.000 toneladas de fruto de açaí, sendo que cerca de 90% deste volume corresponde a resíduos gerados após o processamento agroindustrial do fruto. Para a população amazônica, o açaizeiro exerce um papel sócio-cultural e econômico bastante significativo. O açaí, além de ser muito consumido pela população regional, está conquistando um forte mercado nas regiões sul e sudeste do Brasil(AQUINO, 1999).Na Amazônia brasileira o açaí é consumido principalmente em forma de suco de consistência pastosa(OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000). Segundo Teixeira et. al (EMBRAPA, p.21), o caroço do açaí apresenta teor acima de 48% de carbono, e por ser uma fonte rica de carbono seu resíduo é muito utilizado como ingrediente na compostagem ou na produção de adubo orgânico. O Pará é um dos líderes na produção de açaí e gera anualmente 93.521 toneladas de caroço.

**Figura 5-**Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). A- Fruto. B - Semente do Açaí.



Fonte:Shutterstock e Pulsar

### 2.3.2 Casca de cupuaçu

O cupuaçuzeiro é uma planta de grande importância para a região Amazônica. Seu fruto, o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), é considerado dentre as frutas tropicais nativas da Amazônia, aquela que reúne as melhores condições de aproveitamento industrial (CHAAR, 1980). Esta espécie é localizada principalmente nas áreas de mata do sul e nordeste da Amazônia oriental brasileira e nordeste do Maranhão e também na região Amazônica de países vizinhos (SCHWAN et al., 2000).

O Brasil produz entre 12.000 t a 15.000 t/ano de polpa de cupuaçu, sendo que mais de 80% é procedente de pomares comerciais. Entretanto, a área cultivada desse fruto tem apresentado expressivo aumento, estimando-se em 25.000 ha. Os estados que mais se destacam na produção do cupuaçu são Rondônia, Pará, Amazonas e Acre (CARVALHO et al., 2004). Essa cultura tem tendência ao crescimento acentuado a curto e médio prazo em virtude do amplo mercado, da grande aceitabilidade dos derivados do fruto e de ser um importante componente dos sistemas agroflorestais (SOUZA et al., 1999). Nas últimas décadas, tem se observado que o cultivo do cupuaçuzeiro tornou-se importante para a agricultura do norte do Brasil contribuindo para fixação do homem no campo, pois é realizado por grupos de famílias em pequenas propriedades rurais, durante praticamente o ano todo (ALVES, 2002). A produção de polpa de cupuaçu para os estados do Acre, Rondônia, Pará e Amazonas é estimada em um total de 2418 a 2569 toneladas, sendo que em Manaus a estimativa de consumo de polpa de cupuaçu era de 255 toneladas no ano de 1995. A produção em 2004, chegou a 32 toneladas de frutos, representando 8,2% do valor bruto da produção agrícola do estado do Pará (SOUZA & SANTOS, 1996; RODRIGUES, 2010).

Produtos oriundos da polpa do cupuaçu como sucos, néctar, iogurtes, sorvetes, cremes, licor, tortas, geléias, compotas, biscoitos, sorvetes e outros doces são processados de forma artesanal, em pequenas escalas de produção, gerando renda para a população (COHEN; JACKIX, 2005). Da semente do fruto do cupuaçu pode ser obtido o cupulate, produto semelhante ao chocolate. A amêndoa é um dos componentes do chocolate branco e a manteiga está sendo estudada pela indústria de cosméticos; já a casca vem sendo aproveitada na produção de biojóias e como adubo orgânico (FERREIRA; NOGUEIRA; DAMIAO FILHO, 2006).

O teor de frutose em frutos de cupuaçu varia em torno de 1,20 a 1,47%, já o teor de glicose é de 0,7 a 1,20%; quanto a sacarose a polpa apresenta cerca de 5%. E os valores de pH variam de 2,96 a 3,08 (MATOS, 2007). No fruto, a concentração de sólidos solúveis (°Brix) é de  $10 \pm 0,01$ , o teor de polpa (%)  $44 \pm 0,20$ , açúcares redutores (g/l)  $16,47 \pm 0,01$  e açúcares não

reduzidos (g/l)  $35,04 \pm 0,01$  (FERREIRA; RODRIGUE; CATARINO, 2011). Essas características químicas indicam que o cupuaçu apresenta potencial para a produção de biocombustíveis.

**Figura 6-** Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).



Fonte: danbrandao.com

### 2.3.3 Casca de macaxeira

A macaxeira (*Manihot esculenta*) tem importância econômica, social e cultural no Brasil, país considerado um dos maiores produtores mundiais dessa espécie, com a produção anual estimada em 27 milhões de toneladas. As maiores produções são registradas nos estados do Paraná, Pará, Bahia e Piauí (ZEOULA et al., 2002). O cultivo da macaxeira vem sendo aperfeiçoado pelas novas tecnologias assegurando-lhe o status de cultura comercial, sendo seu amido utilizado em diversos produtos industrializados (SALLA et al., 2010).

A raiz da macaxeira é um alimento comum em países tropicais e semi-tropicais, sendo nativa do Brasil e cultivada em grande parte do território. Seus resíduos, que incluem a casca e entrecasca, podem ser usados na alimentação animal (BOSCOLO et al., 2002). Ao se comparar a macaxeira a outros cultivos observamos que esta cultura possui várias vantagens, tais como, elevado teor de amido, alta capacidade de tolerar estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos pobres, propagação fácil, pouco exigente em insumos modernos, potencial resistência a doenças e pragas (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

Além disso, essa raiz é adequada para a metodologia desacarificação, pois possui concentrações de amido entre 30 a 35% e de água entre 60 a 65% (SURMELY et al., 2003). Há relatos do uso da macaxeira na produção de diversos tipos de bebidas e alimentos tradicionais. Já foram realizados estudos sobre fermentação alcoólica a partir do amido da macaxeira, com uma produção significativa de etanol, atingindo este, a quantidade final de 39,19 mL/L com uma

eficiência no processo fermentativo de 71,43% (AGUSTINI; JUNIOR, 2007). Além disso, foram realizados estudos a partir da casca da mandioca que demonstraram que esta é um substrato com potencial para produção de bioetanol (SIVAMANI; BASKAR; NADU, 2014).

**Figura 7.** Macaxeira (*Manihot esculenta*)



Fonte: caldoefreddo.com

#### 2.3.4 Casca de pupunha

A pupunha (*Bactris gasipaes*) é um fruto importante na dieta das populações da Amazônia Ocidental, da Costa Rica e da Costa do Pacífico da Colômbia (FAO, 1987). Localizando-se, principalmente, em áreas com altitudes inferiores a 900 m (BOVI; BASSO; TUCCI, 1998). A população amazônica utiliza ou conserva os frutos da pupunha de várias maneiras, tais como: a desidratação (farinha), apertização (juntamente com xarope de açúcar ou salmoura), fritura e cocção com ou sem adição de sal. O processamento e a conservação são realizados de modo artesanal ou em escala doméstica (ANDRADE; PANTOJA; MAEDA, 2003).

Na pupunha, 58,5 + 05 % do mesocarpo é água, 34,2 + 0,6 % é cinza, a composição de carboidratos como amido e conteúdo de “fibra dietética” é de 19,2-30,2 % e 5.3 - 9.77%, respectivamente, sendo assim componentes químicos variáveis (METZLER et al., 1992). A pupunheira é uma palmeira de alto potencial econômico tanto pela exploração do palmito, como pelos seus frutos ricos em nutrientes, que podem ser empregados tanto na alimentação humana como na ração animal (MORAES, 2011). No entanto, a casca desse fruto é desprezada sem reutilização, por esse motivo, são importantes novas pesquisas para o melhor aproveitamento biotecnológico deste resíduo.

**Figura 8** - Pupunha (*Bactris gasipaes*). A – Pupunheira. B – Cacho de Pupunha.



Fonte: Tainagaspar.com

### 2.3.5 Casca de tucumã

O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer, *Arecaceae*), também conhecido como tucumã-do-amazonas ou tucumã-açu, é frequentemente encontrado na Amazônia ocidental e Central de onde pode ter se dado sua origem e depois se estendido por toda a Amazônia, Guiana, Peru, Colômbia, Pará e Mato Grosso, no Brasil (FAO, 1987).

A polpa do tucumã é apreciada pela população na forma *in natura* ou como recheio de sanduíches, tapiocas, cremes e sorvetes (MIRANDA et al., 2001). A exploração da polpa de tucumã e de seus derivados representa uma atividade econômica expressiva e crescente no âmbito regional (FERREIRA; GENTIL, 2006). Foram comercializadas 367,8 t de frutos de tucumã nas feiras e mercados de Manaus entre maio de 2011 e abril de 2012 (DIDONET; FERRAZ, 2014).

A partir da polpa e das sementes do tucumã podem ser extraídos óleos comestíveis para uso na produção de ração animal e para suplementação alimentar para humanos. O endocarpo é utilizado na indústria de bijóias e na produção de artesanatos (RAMOS et al., 2009). Apesar de ser obtida de modo extrativista, a polpa do tucumã é aproveitada de várias formas o que aumenta a demanda pelo fruto e desperta o interesse dos produtores pelo cultivo comercial (FAO, 1987). Pesquisas recentes demonstram potencial para aproveitamento das amêndoas para produção de biodiesel (BARBOSA et al., 2009). A casca do tucumã é composta de potássio,

cálcio, selênio e fibra alimentar, verifica-se, portanto, a viabilidade de utilização da mesma (YUYAMA, 2005).

**Figura 9** – Tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)



Fonte: [cienciaempauta.am.gov.br](http://cienciaempauta.am.gov.br)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Investigar a utilização dos hidrolisados obtidos a partir de resíduos vegetais descartados em feiras abertas da cidade de Manaus-AM-Brasil para produção de bioetanol.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Selecionar quais dos resíduos é mais susceptível a hidrólise ácida e quais os mais susceptíveis a hidrólise enzimática.
- Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados ácidos selecionados.
- Investigar a influência dos fatores da hidrólise ácida e dos fatores da hidrólise enzimática no teor de açúcares redutores a partir dos resíduos selecionados.

**CAPÍTULO I****ARTIGO I**  
**Hidrolisados ácidos de resíduos amazônicos para produção de bioetanol**

Artigo a ser enviado à revista World journal of microbiology and biotechnology.

## Hidrolisados ácidos de resíduos amazônicos para produção de bioetanol

Flávia Fernandes<sup>1</sup>, João de Souza<sup>2</sup>, João Paulo da Silva<sup>3</sup>, Amanda Farias<sup>4</sup>, Ralyvan Santos<sup>4</sup>,  
Daiana Torres<sup>3</sup>, Érica de Souza<sup>4</sup>

1-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Univ. do Estado do Amazonas - UEA. 2 Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. 3 Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. 4 Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

### Resumo

Os problemas relacionados ao uso combustíveis fósseis tem aumentado o interesse em combustíveis renováveis como o bioetanol. Resíduos vegetais lignocelulósicos podem ser hidrolisados e dar origem a açúcares fermentescíveis. Dessa forma, o presente trabalho objetivou a utilização do hidrolisado ácido produzido a partir de resíduos vegetais amazônicos para produção de bioetanol e avaliou os fatores relacionados à obtenção de um hidrolisado a partir de um planejamento fatorial. Foram estudados os seguintes resíduos: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), palha da semente do açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*). Foi realizada a hidrólise dos resíduos (Resíduo 10% p/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% v/v, 15 min, 120 °C) e a caracterização de seus monômeros (HPLC). Em seguida, a influência dos fatores de hidrólise (tempo de hidrólise, razão ácido por sólido e razão sólido por líquido), do resíduo selecionado, foram estudados por experimentos baseados um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Dentre os resíduos estudados, os hidrolisados da casca da macaxeira e da casca de pupunha apresentaram as maiores concentrações de monômeros. Após processo de concentração, o hidrolisado da pupunha apresentou-se com 58,47 g/L, sendo que, o experimento de fermentabilidade demonstrou que esses são em grande parte fermentescíveis. Quanto aos experimentos realizados para avaliar os fatores relacionados à obtenção de um hidrolisado de pupunha a partir de um planejamento fatorial observou-se o máximo teor de açúcares utilizando-se a Razão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/casca de pupunha 0,63 g/g e a razão sólido/líquido de 0,1707 g/g. Esses experimentos demonstram o potencial do hidrolisado da casca de pupunha para produção de etanol.

**Palavras chaves:** substratos lignocelulósicos, sacarificação, otimização.

### 1. INTRODUÇÃO

A política de redução das emissões de gases de efeito estufa e os altos preços do petróleo são as principais causas para o comércio de biocombustíveis. Além disso, o aumento estimado da população mundial para 9,6 bilhões de pessoas até 2050 e da produção de etanol em até 3,4 vezes até 2035 faz com que a busca por fontes renováveis de biomassa se torne cada vez mais essencial (JUNGINCER et al.,2011; IEA, 2012; WPP,2013). Com esse intuito, nos últimos anos, tem-se promovido o uso de resíduos agroindustriais para a produção de baixo custo do bioetanol e cada região do mundo tem focado em um resíduo de local para utilizar na indústria de biocombustíveis. Dentre os vários trabalhos encontrados na literatura, pode ser citado o trabalho

sobre a produção de bioetanol a partir do hidrolisado ácido e enzimático da casca de tomate publicado por Khawla (2014).

A Amazônia possui diversas biomassas, como os resíduos do açaí, tucumã, cupuaçu, pupunha e macaxeira. Com a utilização desses resíduos citados como fonte de energia, seria possível diminuir os problemas causados pela falta de combustíveis que nos dias de hoje se classifica como uma das principais prioridades do mundo, assim como para as comunidades existentes na Amazônia. Nas feiras de Manaus podem ser encontradas toneladas de resíduos (CLARICE MANHÃ, 2014). Todos esses resíduos são ricos em celulose e alguns deles ricos em amido. Entretanto, poucos estudos foram realizados para investigar o potencial biotecnológico desses substratos.

A utilização desses resíduos possui potencial para trazer grandes benefícios, desde a coleta que poderá ser realizada pelos próprios agricultores gerando renda extra, até o desenvolvimento de uma indústria regional para a produção de bioetanol na região. Assim, o resíduo, antes descartado, se tornará matéria-prima para geração de etanol para o estado, agregando valor à matriz produtiva da fruta, reduzindo, assim, o risco de perdas provocado por sua comercialização (SOUZA et al, 2012). Além disso, contribui para o balanço de carbono favorável, já que o álcool produzido não contribui para agravar o efeito estufa.

Assim, o presente trabalho teve como finalidade investigar a utilização dos hidrolisados ácidos obtidos a partir de resíduos vegetais amazônicos para produção de bioetanol e investigar a influência dos fatores de hidrólise na obtenção para obtenção de hidrolisado com resíduo selecionado.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Resíduos

Os resíduos de casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), palha da semente de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*) foram obtidos nas feiras abertas da cidade de Manaus- AM entre janeiro e abril, foram secos a 80 °C , triturados (>3mm de diâmetro) e mantidos a 25 °C.

## 2.2 *Microrganismo*

Nos bioprocessos de fermentação alcoólica foi utilizada a linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 (Pedra 2) obtida no Centro de Tecnologia Canavieira, SP. A levedura foi reativada em placas com Ágar Sabouraud (dextrose 40 g/L, peptona 10g/L e 20g ágar) e armazenada a 4°C.

## 2.3 *Seleção dos resíduos regionais para fermentação alcoólica*

### 2.3.1 *Análises de composição dos hidrolisados ácidos*

Os hidrolisados ácidos das cascas de macaxeira, pupunha, cupuaçu, tucumã e açaí foram caracterizados quanto a sua composição de monômeros e inibidores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Waters com detector de índice de refração e uma coluna BIO-RAD Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N com fluxo de 0,6 ml min<sup>-1</sup>; volume de amostra de 20 µl.

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram também determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) em equipamento Waters com detector de UV e coluna RP-18 nas seguintes condições: temperatura de 25 °C; eluente: solução de acetonitrila/água 1:9 (v/v) com 1% de ácido acético, num fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra de 20 µL.

### 2.3.2 *Obtenção de hidrolisados por via ácida*

Para a seleção do melhor resíduo foi realizada hidrólise ácida como descrito por Oberoi (2011). Resumidamente, em Erlenmeyers de 2000 mL, foram colocados 100 g do resíduo e 1000 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 4% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 121 °C por 15 min em autoclave. O hidrolisado foi coletado no frasco receptor por meio de filtração em papel filtro (15 µm) e caracterizado, quanto aos açúcares e furfurais, quando não tratado e quando tratado (destoxificação com carvão ativado e ajuste para o pH 5,0 com NaOH 5M).

### 2.3.3 *Seleção dos hidrolisados mais adequados para a produção de bioetanol*

Os hidrolisados ácidos tratados (100 mL) com maior teor de açúcares redutores foram submetidos ao processo de concentração em estufa térmica a 80 °C e filtração em carvão ativado. Em seguida, foi realizada a fermentação por 72 hs com a linhagem PE-2 de *S. cerevisiae*, em condições anaeróbias (pH 5,0, 32 ° C, 100 rpm) em um frasco erlenmeyer de 125 mL com

bloqueio de entrada de ar (ARAPOGLOU, et al, 2010). Os inóculos foram preparados adicionando-se uma alçada de cultivo recente (até 48h) em 100mL de meio fermentativo homogeneizando em shaker por 24h a 100 rpm Em seguida, 10 mL foram retirados e diluídos 1:1 em água destilada; desta solução, uma alíquota foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer. Após a contagem de células, retirou-se o volume necessário para obter um inóculo com  $1 \times 10^7$  cel/mL.

#### 2.4 Otimização da hidrólise ácida para a produção de etanol

A avaliação da influência da razão  $H_2SO_4$ /casca de pupunha, razão sólido-líquido e do tempo de hidrólise na concentração de açúcares redutores e furanos foi realizada a partir de um delineamento experimental. Nesse estudo foram selecionadas as seguintes variáveis independentes do processo: razão de ácido ( $H_2SO_4$ : 0,1 a 0,63 g/g de casca), razão sólido-líquido (0,02 -0,17 g/L ) e tempo (4,4 – 25,6 min), sendo a temperatura de 121 °C . Para tanto, um planejamento fatorial de  $2^3$  com 3 repetições no ponto central gerou 11 experimentos de sacarificação. Os níveis gerados pelo programa STATGRAPHICS PLUS v. 4.1, são apresentados na Tabela 1.

**Tab. 1.** Níveis utilizados para determinar as concentrações de  $H_2SO_4$ / casca (g/g), Sólido-líquido e o Tempo (min) observados no planejamento fatorial  $2^3$ .

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
<b>Razão (<math>H_2SO_4</math> Casca (g/g))</b>	0,1084	0,37	0,6316
<b>Razão Sólido-Líquido</b>	0,0293	0,1	0,1707
<b>Tempo (min)</b>	4,4	15	25,6

A reação de hidrólise ácida foi realizada em reator com capacidade de 125 mL, sob a temperatura de 121°C nos tempos determinados no planejamento. Os reatores foram carregados com cascas de pupunha e ácido sulfúrico conforme as proporções apresentadas na tabela do planejamento fatorial acima. Visando à remoção de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, o hidrolisado foi filtrado com carvão ativo e, em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro de 15 µm e o pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1M. O hidrolisado obtido foi estocado a 4-8 °C até a sua utilização.

## 2.5 Ensaio Analíticos

### 2.5.1 Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959). As amostras foram centrifugadas á 3.500 rpm por 5 minutos, diluídas em H<sub>2</sub>O e transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL da solução do reagente DNS. Após aquecimento em banho-maria, em temperatura de ebulição por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente, foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm de cada amostra em espectrofotômetro digital FEMTO 700S. O branco da reação, utilizado para calibrar o aparelho, foi obtido utilizando somente 1 mL de água destilada. A absorbância observada foi correlacionada em concentração de açúcar redutor (AR) utilizando uma curva padrão de glicose.

### 2.5.2 Furanos

A determinação de furanos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por MARTINEZ (2000). Foi avaliada a diferença entre a absorvidade de 284 e 320 nm de acordo com a equação:  $(A_{284} - A_{320}) = 0.127 \cdot \text{Furanos Totais (mg/L)} + 0.056$ . Em todas as determinações, os hidrolisados foram previamente centrifugados (15 min a 10.500 G) e o pH ajustado para 7,0 com tampão fosfato 0,1 M. A absorbância da solução no espectro visível foi determinada contra água destilada em um equipamento UV/visível FENTON 600 plus.

### 2.5.3 Biomassa

O crescimento celular de *S. cerevisiae* foi determinado medindo a absorbância em UV-espectrofotometria a 600 nm do caldo de fermentação, sem centrifugação, essa absorbância foi correlacionada com uma curva de calibração biomassa (peso seco) por densidade óptica.

### 2.5.4 Etanol

Fermented media were steam-distilled and ethanol concentration in the distillation product was determined by spectrophotometer (FEMTO) at 600 nm using the potassium dichromate method (Zimmermann 1963).

### 2.5.5 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas. Análise da influência de variáveis por meio de planejamento fatorial foi realizada utilizando o software profissional STATGRAPHICS PLUS v. 4.1.

Os valores de rendimento das fermentações representados pelo fator de conversão de açúcares totais em biomassa ( $Y^{x/s}$ ) foram calculados de acordo com a Eq. 2.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)}$$

$X_f$  - concentração de Biomassa no tempo final de fermentação, g L<sup>-1</sup>  
 $X_0$  - concentração de Biomassa no início do processo fermentativo, g L<sup>-1</sup>  
 $S_0$  - concentração inicial de açúcares no início da fermentação, g L<sup>-1</sup>  
 $S_f$  - concentração de açúcares no final da fermentação, g L<sup>-1</sup>.

Os valores de produtividade total em etanol obtidos nas fermentações (P) foram expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume teórico (g h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) e obtidos pela Eq. 3.

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(\text{Tempo})}$$

### 3. RESULTADOS

Objetivando-se conhecer a composição química dos hidrolisados investigados no presente trabalho, estes foram caracterizados quanto a sua concentração de monômeros e de inibidores de bioprocessos por Cromatografia Líquida de Alta eficiência. A Tabela 2 apresenta a composição química dos hidrolisados e a Tabela 3 apresenta a composição química dos hidrolisados após o processo de destoxificação (filtração em carvão ativado).

**Tab. 2.** Concentração de monômeros, furfural e hidroximetil-furfural em hidrolisados ácidos de resíduos amazônicos.

<b>HIDROLISADOS</b>					
<b>Características químicas</b>	<b>Casca de macaxeira</b>	<b>Casca de pupunha</b>	<b>Casca de cupuaçu</b>	<b>Casca de Tucumã</b>	<b>Palha da semente do Açaí</b>
Glicose (g/L)	16,3 ± 0,07	32,5 ± 2,33	0,19 ± 0,12	1,04 ± 0,07	0,45 ± 0,05
Arabinose (g/L)	0,32 ± 0,01	1,04 ± 0,10	0,20 ± 0,12	2,52 ± 0,19	0,59 ± 0,07
Xilose (g/L)	1,42 ± 0,04	7,11 ± 0,65	2,5 ± 0,32	5,47 ± 0,50	11,13 ± 0,3
Furfural (mg/L)	8,69 ± 1,16	22,0 ± 1,13	36,49 ± 2,7	7,54 ± 2,08	71,09 ± 6,5
HMF (mg/L)	69,2 ± 2,77	188,8 ± 16,9	17,17 ± 5,9	19,0 ± 3,85	31,67 ± 1,83

Os hidrolisados da casca da macaxeira e da casca de pupunha apresentaram as maiores concentrações de monômeros, especialmente glicose. O hidrolisado da palha da semente do açaí apresentou a menor concentração de glicose e a maior concentração de xilose (Tab.2). Pode-se observar que o tratamento com carvão ativado eliminou grande parte dos inibidores (HMF e furfural), no entanto, parte dos açúcares (Glicose, Xilose e Arabinose) foi perdida durante este processo: Macaxeira: 22,33 %, Pupunha: 37,15 %, Cupuaçu: 47,9%, Tucumã: 34,27% e Açaí: 38,6% (Tab 2).

**Tab. 3.** Concentração de monômeros, furfural e hidroximetil-furfural de resíduos amazônicos após destoxificação por carvão ativado.

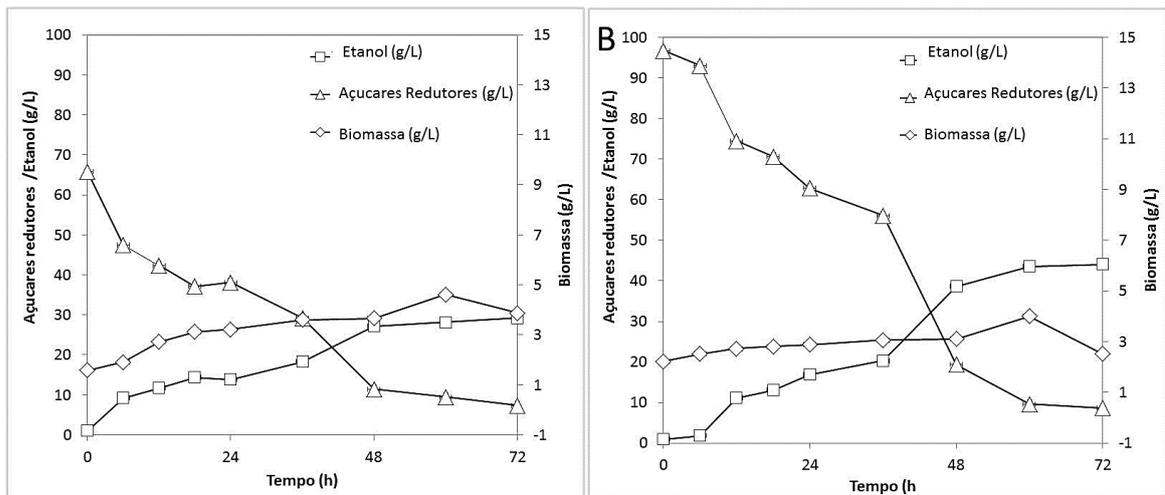
<b>HIDROLISADOS</b>					
<b>Características químicas</b>	<b>Casca de macaxeira</b>	<b>Casca de pupunha</b>	<b>Casca de cupuaçu</b>	<b>Casca de Tucumã</b>	<b>Palha da Semente do Açaí</b>
Glicose (g/L)	13,48 ± 0,07	23,7 ± 2,33	0,185 ± 0,12	0,81 ± 0,076	0,30 ± 0,05
Arabinose(g/L)	0,27 ± 0,01	0,80 ± 0,10	0,145 ± 0,15	1,91 ± 0,197	0,44 ± 0,076
Xilose (g/L)	1,19 ± 0,05	5,47 ± 0,65	1,67 ± 0,23	4,72 ± 0,5	8,15 ± 0,3
Furfural (mg/L)	-	-	-	-	-
HMF (mg/L)	20,13 ± 13,9	14,87 ± 0,24	-	-	-

- valores baixos não detectados pela cromatografia.

Com a finalidade de avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados ácidos da casca de macaxeira e de pupunha, um ensaio de fermentabilidade (fermentação alcoólica) foi realizado. Para tanto, os hidrolisados ácidos das cascas de pupunha e macaxeira foram submetidos à

concentração e detoxificação que resultaram em hidrolisados contendo 65,75 g/L e 96,68 g/L de açúcares redutores (AR), respectivamente. Foi observado que, durante a fermentação dos hidrolisados de pupunha e macaxeira foi consumida grande parte dos açúcares disponíveis nos hidrolisados, cerca de 60 g/L dos açúcares do hidrolisado da pupunha e 88,05 g/L dos açúcares do hidrolisado da macaxeira, enquanto a concentração celular da linhagem PE-2 variou de 1 a 4 g/L nos hidrolisados analisados, um rendimento de 0,5 e 0,34 g / g de conversão de açúcares totais em biomassa ( $Y_{x/s}$ ), respectivamente. A produção de etanol pela linhagem PE-2 nos hidrolisados concentrados de pupunha foi de 29,2 g/L e de 44,0 g/L no hidrolisado da macaxeira. Foi observada uma promissora produtividade em etanol de 0,4 g / L / h e de 0,61 g / L / h nos hidrolisados da casca de pupunha e da casca de macaxeira, respectivamente. (Figura 1).

**Fig. 1** Concentração de açúcares redutores (g/L), produção de etanol (g/L) e biomassa (g/L) durante a fermentação alcoólica do hidrolisado ácido de casca de pupunha (*Bactris gasipaes*) (A) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*) (B).



Foram realizados experimentos de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$  (triplicata no ponto central) com a finalidade de investigar a influência dos fatores de hidrólise ácida (Razão  $H_2SO_4$ /Casca, Razão Sólido/Líquido e Tempo) nas variáveis de resposta: [Açúcares redutores] e [Furanos]. A Tab. 4 apresenta os níveis dos fatores empregados e resultados das variáveis de resposta. A concentração de açúcares redutores variou de 1,6 até 48,9 g/L, demonstrando a importância dos fatores investigados.

**Tab.4** Influência do tempo de hidrólise e da razão  $[H_2SO_4]/[casca\ de\ pupunha]/$  Razão Sólido-Líquido na concentração de AR do hidrolisado e furanos totais em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial  $2^3 +$  pontos centrais.

Exp.	Razão $H_2SO_4/Casca$ (g/g)	Razão Sólido-Líquido (g/g)	Tempo (min)	Açúcares Redutores (g/L)	Furanos (mg/L)
1	0,37	0,1	15	25,92	8,8
2	0,6316	0,1707	4,4	48,93	21,6
3	0,1084	0,1707	25,6	16,64	12
4	0,6316	0,0293	4,4	6,39	10
5	0,1084	0,1707	4,4	21,67	4,4
6	0,6316	0,1707	25,6	37,13	22
7	0,1084	0,0293	4,4	1,6	0,6
8	0,6316	0,0293	25,6	6,12	4,2
9	0,37	0,1	15	27,08	6,5
10	0,37	0,1	15	23,48	7,4
11	0,1084	0,0293	25,6	2,95	0,7

Os efeitos principais e suas respectivas interações calculadas a partir dos dados da Tab.4 são apresentados na Tab. 5. Os erros padrão ( $\sigma$ ) dos efeitos foram calculados a partir das replicatas do ponto central (Tab. 4). Segundo Barros Neto et al. (1995), ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que “ $t_v \times \sigma$ ”, onde  $t_v$  é o valor do teste t para  $v$  graus de liberdade. O valor do teste t para 2 graus de liberdade ( $t_2$ ), ao nível de 95% de confiança é 4,313.

**Tab. 5** Efeito das variáveis testadas para a produção de açúcares redutores e de furanos obtida, calculados a partir dos dados apresentados na Tab. 4

Efeitos estimados	Açúcares Redutores (g/L)	Furanos (mg/L)
Média	19,80 ± 0,55*	8,92 ± 0,35*
A: Razão $H_2SO_4/casca$ (g/g)	13,92 ± 1,30*	10,02 ± 0,82*
B: Razão Sólido/ Líquido (g/g)	26,82 ± 1,30*	11,12 ± 0,82*
C:Tempo	- 3,93 ± 1,30	0,57 ± 0,82
AB	9,94 ± 1,30*	3,57 ± 0,82
AC	- 2,09 ± 1,30	- 3,27 ± 0,82
BC	- 4,47 ± 1,30	3,42 ± 0,82

Os erros padrão em um erro puro com 2 graus de liberdade

\*Efeitos com significado estatístico ao nível de 95% de confiança.

Quanto à concentração de açúcares redutores, os fatores Razão  $H_2SO_4/casca$ , Razão Sólido/Líquido e a interação desses apresentaram significância estatística. Considerando-se esses efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tab. 4 e esse foi descrito na Equação 1. Quanto à concentração de furanos, somente os fatores Razão  $H_2SO_4/casca$  e Razão Sólido/Líquido apresentaram significância estatística (Equação 2).

Açúcares Redutores =  $19,8 + (13,92 \cdot \text{Razão H}_2\text{SO}_4/\text{casca}) + (26,82 \cdot \text{Razão Sólido/Líquido}) + (9,94 \cdot \text{Razão H}_2\text{SO}_4/\text{casca} \cdot \text{Razão Sólido/Líquido})$  (Equação 1)

Furanos =  $8,92 + (10,02 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4/\text{casca}) + (11,12 \cdot \text{Razão Sólido/Líquido})$  (Equação 2)

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático descrito na Equação 1 (Tab. 6). Esse modelo matemático apresentou regressão significativa (90,07%) e seus fatores apresentaram significado estatístico. Também foi realizada uma ANOVA para validação do modelo matemático apresentado pela Equação 2 (Tab. 7). O modelo matemático da Equação 2 apresentou regressão significativa (84,59%), seus fatores apresentaram significado estatístico e a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 6** Análise de variância para a variável de resposta açúcares redutores em hidrolisados ácidos de casca de pupunha obtidos sob diferentes razões de  $[\text{H}_2\text{SO}_4]/[\text{casca de pupunha}]$ , razões de Sólido-Líquido e tempos de hidrólise.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do quadrado	F-Ratio	p-valor
<b>A: Razão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/casca (g/g)</b>	387,951	1	387,951	25,87	0,0023
<b>B: Razão Sólido-Líquido (g/g)</b>	1439,43	1	1439,43	95,99	0,0001
<b>AB</b>	197,906	1	197,906	13,20	0,0109
<b>Falta de ajuste</b>	133,239	1	133,239	8,89	0,0246
<b>Erro puro</b>	89,9712	6	14,9952		

R<sup>2</sup> = 90,07 %

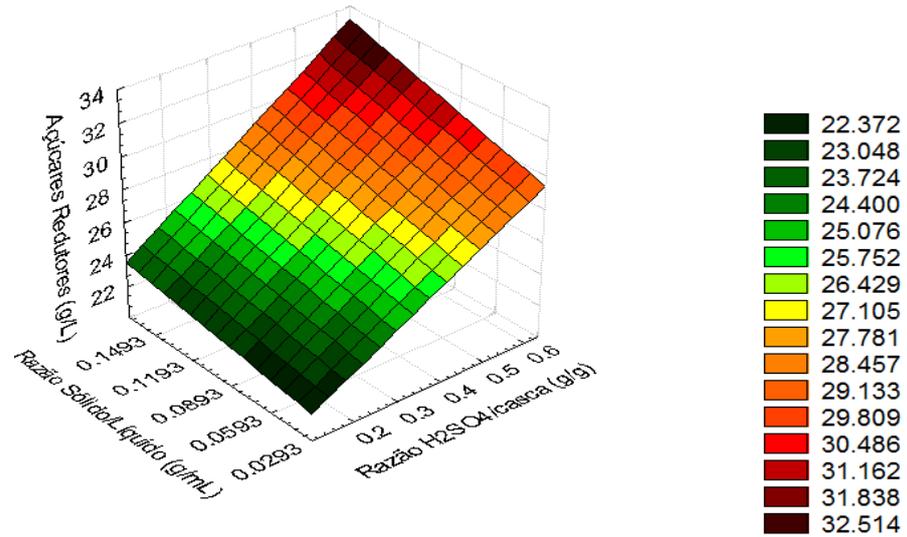
**Tab. 7** Análise de variância para a variável de furanos em hidrolisados ácidos de casca de pupunha obtidos sob diferentes razões de  $[\text{H}_2\text{SO}_4] / [\text{casca de pupunha}]$ , razões de Sólido-Líquido e tempos de hidrólise.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do Quadrado	F-Ratio	p-valor
<b>A: Razão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/casca (g/g)</b>	201,001	1	201,001	24,88	0,0025
<b>B: Razão Sólido-Líquido (g/g)</b>	247,531	1	247,531	30,64	0,0015
<b>Falta de ajuste</b>	33,1977	2	16,5988	2,05	0,2091
<b>Erro puro</b>	48,4717	6	8,07861		

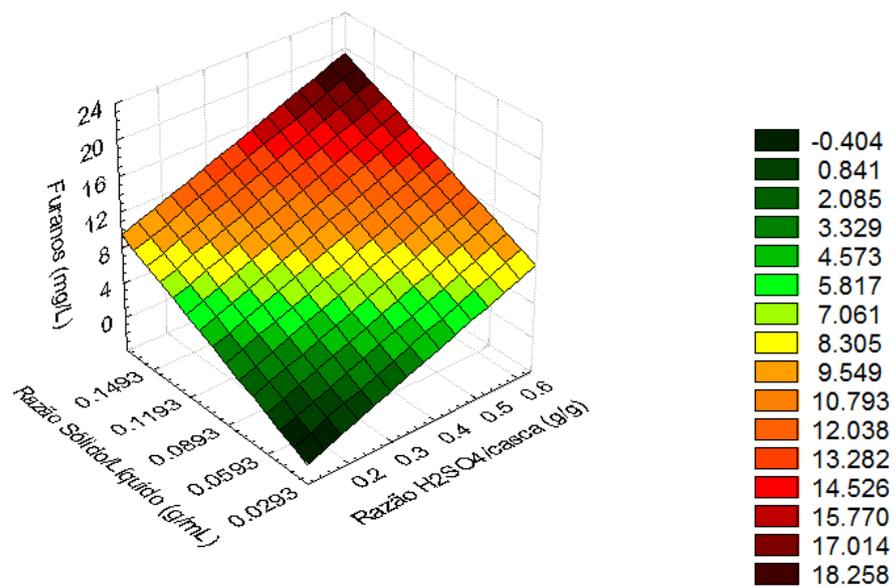
R<sup>2</sup> = 84,59 %

Para representar os resultados de açúcares redutores e da concentração de furanos foram elaboradas superfícies de resposta (Fig. 2 e Fig. 3), para tanto, foram utilizados os dados gerados pelos modelos avaliados (Equação 1 e Equação 2). As superfícies de respostas construídas demonstraram que, nas condições experimentais, máximo teor de açúcares é obtido utilizando-se a razão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/casca de pupunha 0,63 g/g e a razão sólido/líquido de 0,1707 g/g (Fig. 2 e Fig. 3).

**Fig. 2** Superfície de Resposta demonstrando o efeito da razão Sólido – Líquido e da razão  $H_2SO_4$ /casca (g/g) de pupunha na concentração de açúcares redutores (g/L) no hidrolisado ácido da casca de pupunha.



**Fig. 3** Superfície de Resposta demonstrando o efeito da razão Sólido – Líquido e da razão  $H_2SO_4$ /casca (g/g) de pupunha na concentração de furanos (mg/L) no hidrolisado ácido da casca de pupunha



#### 4. DISCUSSÃO

O etanol é um produto de grande importância energética para o mundo e pode ser produzido utilizando hidrolisados de diversos resíduos. No presente trabalho foi possível utilizar resíduos regionais produzidos em feiras abertas para a produção de etanol. O resíduo de casca de pupunha demonstrou ser adequado para a obtenção de açúcares fermentescíveis e possibilitou a produção do etanol.

Dentre os resíduos estudados, os hidrolisados da casca da macaxeira e da casca de pupunha apresentaram as maiores concentrações de monômeros, principalmente de glicose, com 13,4 e 23,7 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Moraes, 2008 caracterizou o hidrolisado hemicelulósico da palha da cevada e obteve 2,4 g/L de glicose no tempo de 40 minutos e concentração de ácido sulfúrico de 1%. Em outro estudo em que utilizaram o hidrolisado de bagaço de cana foi atingida a concentração 5,1 g L<sup>-1</sup> de glicose utilizando 100 mg de ácido sulfúrico por grama de massa seca à 140°C por 20 minutos (Pessoa Júnior et al, 1997) . Possivelmente, os hidrolisados da casca da macaxeira e da casca de pupunha apresentaram maiores concentrações de monômeros por serem oriundos de cascas que possuem resíduos de amido.

Após a destoxificação, por filtração em carvão ativado, os hidrolisados dos resíduos investigados apresentaram menores concentrações de inibidores. Segundo Arruda et al, 2008, o tratamento com carvão ativado reduziu 88,5% de fenóis do hidrolisado de bagaço de cana. Ask. et. al., 2013 mostraram em seu estudo que a máxima concentração de HMF e furfural que permite o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* strain VTT C-10883 foi de 10,3 mM de HMF e 4,2 mM de furfural. Deste modo, as concentrações de furanos geradas durante esse estudo podem ser consideradas baixas e não interferem na produção de etanol.

A partir dos dados de caracterização química dos hidrolisados ácidos, foi possível selecionar os mais adequados para os ensaios de fermentabilidade. Os hidrolisados de macaxeira e pupunha resultaram, após concentração/destoxificação, em 96,68 g/L e 65,75 g/L de açúcares redutores (AR), respectivamente. A produção de etanol pela linhagem PE-2 nos hidrolisados concentrados de macaxeira e pupunha foi de 44,0 g/L e 29,2 g/L, respectivamente, após 72 hs de fermentação. Nesse estudo, foi observado um rendimento de 0,5 e 0,34 g / g de conversão de açúcares redutores em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) nos hidrolisados da casca de pupunha e da casca de macaxeira, e uma promissora produtividade em etanol de 0,4 g / L / h e de 0,61 g / L / h respectivamente. Oberoi et al., 2010a, obtiveram 3.37 g/L/h de etanol a partir do hidrolisado

ácido da casca de laranja. Em outro estudo, Manikandan et. al, 2006, obtiveram a partir do hidrolisado ácido da casca de banana, a produção de etanol de 9,8 g/L após 120 hrs de fermentação com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. As concentrações de etanol encontradas nesse estudo são altas e possivelmente viáveis de serem aplicadas em escala industrial.

Nos experimentos realizados de acordo com planejamento fatorial, observou-se que os efeitos dos fatores A: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /casca de pupunha (g/g), B: razão sólido-líquido e a sua interação AB apresentaram significado estatístico. Portanto, nas condições experimentais, o aumento da concentração de ácido e da biomassa influenciam significativamente no aumento do teor de açúcares redutores, sendo que a concentração de biomassa tem duas vezes mais efeito significativo na obtenção de açúcares redutores do que a concentração do ácido. De acordo com o modelo obtido (Equação 1), aproximadamente 33 g/L de açúcares redutores podem ser obtidos utilizando Razão Sólido- Líquido de 0,1707 (g/g) e Razão 0,6316g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/casca de pupunha (g/g). No trabalho de Woiciechowski, 2002, envolvendo a otimização da hidrólise ácida do bagaço do amido de mandioca, observou-se a obtenção de 62,4 g/L de açúcares redutores utilizando-se na hidrólise 100 g/L de resíduo, ácido a 1 %, temperatura de 120° C e tempo de 10 minutos. Outras condições operacionais utilizadas na obtenção de hidrolisados de diferentes resíduos agroindustriais podem ser observadas na Tabela 8.

**Tab. 8.** Parâmetros ideais para obtenção de hidrolisados de diversos resíduos agroindustriais, determinados por diferentes autores.

Resíduo agroindustrial	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min.)	Referências
<b>Bagaço de Cana-de-açúcar</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7	121	45	(Morais e Broetto, 2012)
<b>Palha de arroz</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	140-145	20	(Roberto et.al.1996)
<b>Resíduos de cervejaria</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	130	15	(Cavalheiro et. al., 2004)
<b>Sorgo</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4	130	75	(Torrado et. al, 2010)
<b>Eucalipto</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	100-130	60	(Parajó et. al., 1997)
<b>Abeto</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4	200	30	(Palmqvist et al., 1998)

\*Adaptada de Morais, 2012.

A concentração dos açúcares redutores nos hidrolisados obtidos foi diretamente correlacionada à concentração de furanos. Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os microrganismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o seu DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (Sanchez & Bautista, 1988; Moding et al, 2002). Um estudo sobre a resistência da levedura *S. cerevisiae* K35 a

inibidores fermentativos demonstrou que essa sofre uma forte inibição presença de concentrações de HMF superiores a 3 g/L (Lee et al., 2011). Nas condições experimentais, os valores de furanos encontrados nos hidrolisados obtidos podem ser considerados pequenos (< 20 mg/L) resultando em pouca influência na fermentabilidade. Dessa forma, o hidrolisado da casca de pupunha, por apresentar uma alta concentração de açúcares e uma baixa concentração de furanos é especialmente atraente para processos fermentativos.

Quanto às limitações do presente estudo, deve-se salientar que: a) as hidrólises foram realizadas em erlenmeyers dentro de autoclave, o que resultou na dificuldade dos controles dos parâmetros físicos.

As informações do presente estudo mostram o potencial que resíduos amazônicos, em especial a casca de pupunha, na geração de energia. O valor desse resíduo antes desconhecido pode vir a ser o início de outros trabalhos utilizando resíduos amazônicos. Novas pesquisas devem ser conduzidas, utilizando outras cepas de leveduras, enriquecendo o mosto com nutrientes ou outros resíduos e avaliando o escalonamento do processo.

## **Agradecimentos**

À agência de fomento FAPEAM e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

## 5. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R., RAMIREZ, J. A., GARROTE, G., & VÁZQUEZ, M. (2002). **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse**. *Journal of Food Engineering*, .55 (4), 309-318.
- ARAPOGLOU, D., VARZAKAS, T., VLYSSIDES, A. & ISRAILIDES, C. 2010. **Ethanol production from potato peel waste (PPW)**. *Waste Management*, 30: 1898–1902.
- ARRUDA, P.V; CHAUD, L.C.S; FELIPE, M.G.A; PIVETTA, L.R. **Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol**. *Nucleus*, v. 5. n. 1 , abr. 2008
- ASK M, BETTIGA M, MAPELLI V, OLSSON L: **The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnol Biofuels* 2013, 6:22
- CANETTIERI, E. V; SILVA, J. B.A ; FELIPE, M.G.A . **Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo , v. 38, n. 3, p. 323-331, Sept. 2002.
- CLARICE MANHÃ. **Comida jogada no lixo em Manaus daria para alimentar 100 mil pessoas**. D24AM, 2014. Disponível em: new.d24am.com. Acesso: 30 de Novembro de 2014.
- IEA (International Energy Agency). **World Energy Outlook**. (2012).
- JUNGINGER, M.; DAM, J.; ZARRILL, S.; MOHAMED, F.A. MARCHAL, D.; FAAIJ; A. **Opportunities and barriers for international bioenergy trade**. *Energy Policy* 2011; 39: 2028.
- MANIKANDAN, K., SARAVANAN, V., & VIRUTHAGIRI, T. (2008). **Kinetics studies on ethanol production from banana peel waste using mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae***. *Indian Journal of biotechnology*, 7(1), 83.
- MARTINEZ A, RODRIGUEZ M.E., YORK S.W., PRESTON J.F., INGRAM L.O. (2000) **Use of UV absorbance To monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass**. *Biotechnology Progress*. 16:637.41.
- MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**. 31, 426 (1959)
- MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. **Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase**. *Biochemistry Journal*, v.363, p.769–776, 2002.
- MORAES, E. J. C. **Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. Lorena, 2008. 157p. (Tese de Doutorado, FAENQUIL, USP).
- OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MADI, R. L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J. P. **Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using**

**optimized parameters through experimental design.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 6, p. 3422–9, 24 mar. 2010b.

OBEROI, H.S., VADLANI, P.V., SAIDA, L., BANSAL, S. & HUGHES, J.D. 2011B. **Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process.** Waste Management, 31: 1576–1584.

PESSOA JÚNIOR., A.; MANCILHA, I.M. de; SATO, S. **Evaluation of sugar hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Hampshire, v. 18, p. 360-363, 1997.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. **Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 10, p.315–318, 1988.

SANTANA, N.B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol.** Dissertação Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2007.

SOUZA, O.; SCHULZ, M. A.; FISCHER, G. A. A.; WAGNER, T. M.; SELLIN, N. Energia alternativa de biomassa: Bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 16, n. 47, p. 915–921, 2012.

WOICIECHOWSKI, A.L, NITSCHKE S., PANDEY A., SOCOOL C.R. (2002) **Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study.** Braz Arch Biol Technol 45:393–400

WORLD POPULATION PROSPECTS. **The 2012 Revision**, Volume 1 Comprehensive Table (United Nations, 2013).

ZIMMERMANN HW Studies on the dicromate method of alcohol determination. **Am. J. Enol. Viticulture**; 14: 205-213 ,1963.

## CAPÍTULO II

<p style="text-align: center;"><b>ARTIGO II</b> <b>Produção de etanol por hidrolisados enzimáticos de resíduos amazônicos</b></p>
---

Artigo a ser enviado à revista Acta Amazônia

## Produção de bioetanol por hidrolisados enzimáticos de resíduos amazônicos

<sup>1</sup>Fernandes, F.S.; <sup>2</sup>Souza, J. V. B. de.; <sup>3</sup>Silva, J.P.A.; <sup>4</sup>Farias, A. V.; <sup>4</sup>Plácido, S. K.O ;<sup>3</sup>Ferreira, I.S.; <sup>5</sup>Pinheiro, S. B.;<sup>4</sup>Souza, E. S. de.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Univ. do Estado do Amazonas - UEA. <sup>2</sup>Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. <sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. <sup>4</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia – EST. <sup>5</sup>Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas - ICB.

### Resumo

O crescente avanço tecnológico, o desenvolvimento social e a necessidade de locomoção por longas distâncias, fazem com que a demanda por combustíveis aumente. Atualmente, a produção de bioetanol por meio de hidrolisados enzimáticos tem aumentado. Essa realidade inspira pesquisas para tentar obter etanol a partir de outras fontes de biomassa. Este trabalho teve como objetivo obter e avaliar a composição de hidrolisados enzimáticos a partir de resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus. Foram estudados os seguintes resíduos: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*). A fim de avaliar a susceptibilidade desses resíduos frente às enzimas Celluclast® 1,5 L,  $\alpha$ -glucosidade e Pectinex Ultra SP-L foi realizada a hidrólise enzimática (4% resíduos, enzima 10 UI/g de resíduo, temperatura de 40 °C, agitação orbital 200 rpm e 48hs de hidrólise), as enzimas foram utilizadas isoladamente e combinadas. O resíduo destacado foi selecionado para ser utilizado em um ensaio para avaliar a influência dos fatores de hidrólise enzimática de acordo com um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Dentre os resíduos caracterizados, o hidrolisado da casca de pupunha apresentou a maior concentração de açúcares redutores (26,5 g/L). Nos ensaios que avaliaram a influência dos fatores de hidrólise enzimática observou-se que, a máxima concentração de açúcares redutores foi obtida quando se utilizou Celluclast® 1.5 L na concentração de 1,233 U/g, temperatura de 51,2 °C e tempo de hidrólise de 59,75 minutos. Esses resultados indicam que o hidrolisado da casca de pupunha é um potencial substrato para produção de etanol.

**Palavras-chave:** substratos, otimização, celulase

### 1. INTRODUÇÃO

Há uma demanda crescente para a produção de etanol por meio de processos de fermentação em todo o mundo, uma vez que as reservas de petróleo estão diminuindo e os preços estão subindo. Os altos preços levaram a crises de energia em países desenvolvidos e em desenvolvimento que dependem do petróleo. Nesse sentido, os biocombustíveis são um alvo crítico de desenvolvimento de energia em muitas partes do mundo se os preços do petróleo ultrapassarem EUA 55 \$ - 60 por barril (Rattanachomsri et al., 2009; Arapoglou et al., 2010; Akponah; Akpomie, 2011).

Atualmente, a sacarificação e fermentação simultâneas são utilizadas na produção de bioetanol a partir de milho. Sivamani e colaboradores, 2014 investigaram a viabilidade da produção de bioetanol a partir da sacarificação e fermentação simultâneas da casca das raízes de

mandioca. A concentração máxima de etanol foi obtida quando foram utilizados 69,82 g/ L de substrato de concentração e 24,74% (v/v) de alfa-amilase. Nessas condições, foi observado um rendimento de 83% de conversão de biomassa em etanol. Esses resultados indicaram que a casca de mandioca poderia servir como um potencial substrato para a produção de etanol. Esse uso prático inspira novas pesquisas para tentar obter bioetanol de outras fontes de biomassa como os resíduos agroindustriais e até mesmo domésticos.

Diariamente, nas feiras abertas da Cidade de Manaus, diversos resíduos são produzidos incluindo: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*). Os sistemas produtivos de nossa região não vêm utilizando esses resíduos que, em sua maioria, acabam no aterro sanitário da cidade gerando problemas relacionados ao transporte, poluição secundária e disposição final.

Deste modo, o presente estudo teve como finalidade investigar a utilização dos hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de resíduos vegetais amazônicos para produção de bioetanol e investigar a influência dos fatores de hidrólise na obtenção de hidrolisados com um resíduo selecionado.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Resíduos

Os resíduos de casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*) foram obtidos nas feiras abertas da cidade de Manaus-AM no período de Dezembro a Fevereiro de 2014. Esses foram secos a 80 °C, triturados (>3mm de diâmetro) e mantidos a 25 °C.

### 2.2 Microrganismo

Nos bioprocessos de fermentação alcoólica foi utilizada a linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 (Pedra 2) obtida no Centro de Tecnologia Canavieira, SP. A levedura foi reativada em placas com Ágar Sabouraud (dextrose 40 g/L, peptona 10g/L e 20g ágar) e armazenada a 4oC.

### *2.3 Hidrólise enzimática dos resíduos*

As hidrólises enzimáticas foram realizadas como descrito por Oberoi (OBEROI et al., 2010b). As reações foram incubadas a 40 °C, durante 48 h sob agitação orbital de 200 rpm. O volume de 50 mL das reações continha 4 % de resíduo triturado (tampão de 50 mM de acetato de sódio pH 5,0) e as enzimas comerciais Celluclast® 1.5 L ( 10 FPU/g de casca ), Pectinex Ultra SP-L ( 10 UI /ml) e  $\alpha$  - glucosidase (10 UI/g) . Essas enzimas foram utilizadas de forma independente e combinadas. Os hidrolisados com maior teor de açúcares fermentescíveis foram conduzidos às demais etapas do trabalho.

### *2.4 Ensaio de fermentabilidade com resíduo selecionado*

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL (com bloqueio de entrada de ar), contendo 50 mL de hidrolisado do selecionado (pH 5) e inoculo da levedura PE-2 ( $1 \times 10^7$  cel/mL). A incubação foi realizada por 72hs a temperatura ambiente e sob agitação orbital de 100 rpm.

### *2.5 Influência dos fatores relacionados à hidrólise enzimática da casca da pupunha com a enzima Celluclast® 1.5 L*

Foi realizado um pré-tratamento, onde o resíduo selecionado (1,00 g) foi suspenso em 50 mL de peróxido de hidrogênio a 1% (v/v). O pH desta suspensão foi ajustado em 11,5 com solução aquosa de hidróxido de sódio e deixou-se em agitação (100 rpm) durante 24 h. O material sólido foi posteriormente lavado com água destilada até pH neutro, seco até massa constante e mantido em dessecador (REYES et al, 1997). O resíduo tratado foi submetido aos experimentos descritos a seguir.

A avaliação da influência da concentração das enzimas Celluclast® 1.5 L, do tempo e da temperatura na concentração inicial de açúcares redutores do hidrolisado foi realizada a partir de um planejamento fatorial  $2^3$  (triplicata no ponto central). Nesse estudo, os seguintes fatores foram investigados: concentração de enzimas Celluclast® 1.5 L (208 – 1233,4 U/g de casca), tempo (10,25 - 59,75 minutos ) e temperatura (8,8- 51,2 ° C). O desenho experimental gerado pelo programa STATGRAPHICS PLUS v. 4.1. é apresentado na Tabela 2.

**Tab. 1.** Níveis utilizados para determinar as concentrações de Celluclast® 1.5 L (U/g Casca), o tempo e a temperatura utilizados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Celluclast® 1.5 L (U/g Casca)	208	725	1233,4
Tempo (min)	10,75	35	59,25
Temperatura (°C)	8,8	30	51,2

A reação de hidrólise enzimática foi realizada em agitador térmico, sob a temperatura e o tempo apresentados na Tabela 2. Os reatores foram carregados com 0,05 g de cascas de pupunha, 1 mL de solução tampão de 50 mM de acetato de sódio e a enzima Celluclast® 1.5 L (conforme as concentrações apresentadas na tabela do planejamento fatorial, acima). Os hidrolisados obtidos foram estocados a 4-8 °C até a sua utilização.

## 2.6 Ensaios Analíticos

### 2.6.1 Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959). As amostras foram centrifugadas á 3.500 rpm por 5 minutos, diluídas em H<sub>2</sub>O e transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL da solução do reagente DNS. Após aquecimento em banho-maria, em temperatura de ebulição por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente, foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm de cada amostra em espectrofotômetro digital FEMTO 700S. O branco da reação, utilizado para calibrar o aparelho, foi obtido utilizando somente 1 mL de água destilada. A absorbância observada foi correlacionada em concentração de açúcar redutor (AR) utilizando uma curva padrão de glicose

### 2.6.2 Glicose

O teor de glicose das amostras foi determinado pelo método colorimétrico utilizando o kit enzimático (Labtest, Brasil), as amostras foram centrifugadas (10.500 G por 5min) a para a leitura das amostras utilizou-se um espectrofotômetro, com leitura da absorbância a 505 nm. A concentração de glicose foi determinada a partir da curva de calibração pré-estabelecida pela Labtest.

### 2.6.3 Biomassa

O crescimento celular de *S. cerevisiae* foi determinado medindo a absorvância e espectrofotometria no UV-a 600 nm do caldo de fermentação, que foi correlacionada com uma curva de calibração (biomassa-peso seco  $\times$  densidade óptica).

### 2.6.4 Etanol

Fermented media were steam-distilled and ethanol concentration in the distillation product was determined by spectrophotometer (FEMTO) at 600 nm using the potassium dichromate method (Zimmermann 1963).

## 2.7 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas. Análise da influência das variáveis sobre a hidrólise enzimática da casca de pupunha foi desenvolvida utilizando o software STATGRAPHICS PLUS v. 4.1.

Os valores de rendimento das fermentações representados pelo fator de conversão de açúcares totais em biomassa ( $Y^{x/s}$ ) foram calculados de acordo com a Eq. 2.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)}$$

$X_f$ - concentração de Biomassa no tempo final de fermentação, g L<sup>-1</sup>  
 $X_0$ - concentração de Biomassa no início do processo fermentativo, g L<sup>-1</sup>  
 $S_0$ - concentração inicial de açúcares no início da fermentação, g L<sup>-1</sup>  
 $S_f$ - concentração de açúcares no final da fermentação, g L<sup>-1</sup>.

Os valores de produtividade total em etanol obtidos nas fermentações (P) foram expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume teórico (g h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) e obtidos pela Eq. 3.

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(\text{Tempo})}$$

### 3. RESULTADOS

Os resíduos de macaxeira, pupunha, cupuaçu, tucumã e açai foram hidrolisados pelas enzimas Celluclast® 1.5 L, Pectinex Ultra SP-L e  $\alpha$  – glucosidase, de forma combinada e individualmente, com a finalidade de conhecer a sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. Em seguida, os hidrolisados enzimáticos obtidos foram caracterizados quanto aos seus teores de açúcares redutores e glicose (Tabela 3). A casca da macaxeira e a casca de pupunha apresentaram-se como os mais susceptíveis a hidrólise enzimática. Pode-se observar que a enzima  $\alpha$ -glucosidase resultou em altas concentrações de açúcares redutores/glicose quando teve como substrato esses dois resíduos. O hidrolisado da palha da semente do açai foi o que apresentou as menores concentrações de glicose.

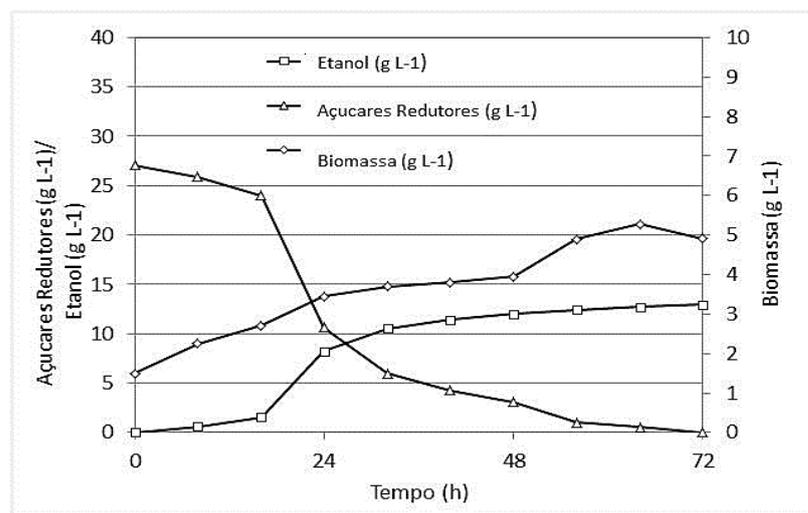
**Tab. 2** Concentração de açúcares redutores (AR) e glicose de hidrolisados enzimáticos de resíduos amazônicos após hidrólise utilizando as enzimas Celluclast® 1.5 L,  $\alpha$  - glucosidase e Pectinex Ultra SP-L separadas e combinadas.

Hidrolisados	Análises	Controle	Pectinex	Celluclast	$\alpha$ – glucosidase	Combinadas
Casca de macaxeira	AR (g/L)	0,36 ± 0,01	2,90 ± 0,01	0,56 ± 0,00	18,6 ± 0,04	19,4 ± 0,02
	Glicose (g/L)	0,08 ± 0,02	2,44 ± 0,13	0,45 ± 0,00	18,4 ± 0,14	16,3 ± 0,06
Casca de pupunha	AR (g/L)	1,42 ± 0,01	6,91 ± 0,01	3,30 ± 0,00	25,8 ± 0,0	26,8 ± 0,01
	Glicose (g/L)	0,06 ± 0,01	1,82 ± 0,01	0,64 ± 0,00	19,1 ± 0,01	23,5 ± 0,34
Casca de cupuaçu	AR (g/L)	0,49 ± 0,01	1,88 ± 0,01	0,45 ± 0,01	1,05 ± 0,03	1,44 ± 0,02
	Glicose (g/L)	0,37 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,16 ± 0,01	1,01 ± 0,05
Casca de Tucumã	AR (g/L)	0,49 ± 0,01	1,43 ± 0,02	0,66 ± 0,02	2,54 ± 0,04	3,63 ± 0,02
	Glicose (g/L)	0,26 ± 0,06	0,75 ± 0,09	0,41 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,83 ± 0,08
Palha da Semente do Açai	AR (g/L)	0,30 ± 0,02	1,96 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,34 ± 0,00
	Glicose (g/L)	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,01

Com a finalidade de avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático da casca de pupunha, esse foi submetido à fermentação alcoólica. O hidrolisado submetido à fermentação foi obtido a partir da combinação das enzimas Celluclast® 1.5 L,  $\alpha$  - glucosidase e Pectinex Ultra SP-L (26,8 g/L de açúcares redutores). Foi observado que, grande parte dos açúcares disponíveis no hidrolisado foi consumida pela linhagem PE-2, enquanto a concentração celular da linhagem PE-2 variou de 1-5 g/L no hidrolisado analisado, um rendimento de 0,15 g / g de conversão de açúcares totais em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) resultando na produção de 12,9 g/L de etanol sendo

observado à produtividade em etanol de 0,18 g / L / h no hidrolisado enzimático da casca de pupunha (Figura 1).

**Fig. 4** Concentração de açúcares redutores (g/L), produção de etanol (g/L) e biomassa (g/L) durante a fermentação dos hidrolisados enzimáticos da casca de pupunha.



Foram realizados experimentos de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$  (triplicata no ponto central) com a finalidade de investigar a influência dos fatores relacionados à hidrólise enzimática da casca da pupunha com a enzima Celluclast® 1.5 L. Foram avaliados os seguintes fatores: concentração da enzima, o tempo e a temperatura de hidrólise tendo como variável de resposta os açúcares redutores. A Tab. 4 apresenta os níveis dos fatores empregados e resultados da variável de resposta. A concentração de açúcares redutores variou entre desde 0,44 até 3,24 g/L, demonstrando a influência dos fatores na variável de resposta estudada.

**Tab.3** Influência da concentração da enzima Celluclast®, do Tempo, e da Temperatura na concentração de AR do hidrolisado em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$  + pontos centrais.

Exp.	Celluclast® 1.5 L U/g Casca)	Tempo (min)	Temperatura	Açúcares Redutores (g/L)
1	208	10,25	8,8	0,44
2	208	10,25	51,2	0,46
3	208	59,75	8,8	0,71
4	208	59,75	51,2	1,10
5	1233,4	10,25	8,8	1,87
6	1233,4	10,25	51,2	2,17
7	1233,4	59,75	8,8	1,94
8	1233,4	59,75	51,2	3,24
9	720,7	35	30	2,07
10	720,7	35	30	2,08
11	720,7	35	30	2,08

Os efeitos principais e suas respectivas interações calculadas a partir dos dados da Tab.3 são apresentados na Tab. 4. Os erros padrão ( $\sigma$ ) dos efeitos foram calculados a partir das replicatas do ponto central (Tab. 3).

**Tab. 4** Efeito das variáveis testadas para produção de açúcares redutores obtida, calculados a partir dos dados apresentados na Tab. 3.

Efeitos estimados	Açúcares Redutores (g/L)
Média	1,60949 +/- 0,00177176
A: Celluclast® 1.5 L*	1,61821 +/- 0,00413546
B: Tempo*	0,42967 +/- 0,00342269
C: Temperatura*	0,44714 +/- 0,00413546
AB*	0,04820 +/- 0,00342269
AC*	0,2975 +/- 0,00408248
BC*	0,28714 +/- 0,00342269

Os erros padrão em um erro puro com 2 graus de liberdade

\*Efeitos com significado estatístico ao nível de 95% de confiança.

Quanto à concentração de açúcares redutores, todos os fatores investigados e suas interações apresentaram significância estatística. Considerando-se esses efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tab. 4 e esse é descrito a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Açúcares} = & 0,484847 + (0,00109732 * \text{Celluclast}) - (0,00107065 * \text{Tempo}) - \\ & (0,00943485 * \text{Temperatura}) + (0,00000226568 * \text{Celluclast} * \text{Tempo}) + \\ & (0,0000136854 * \text{Celluclast} * \text{Temperatura}) + (0,000326377 * \text{Tempo} * \text{Temperatura}) \end{aligned} \quad (\text{Equação 1})$$

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático descrito na Equação 1 (Tab. 6). Esse modelo matemático apresentou regressão de 89,42%.

**Tab. 5.** Análise de variância para a variável de resposta açúcares redutores em hidrolisados de casca de pupunha submetidos a diferentes concentrações de Celluclast 1.5 L, temperaturas e tempos de hidrólise.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do quadrado	F-Ratio	p-valor
<b>A: Celluclast® 1.5 L</b>	5,10388	1	5,10388	153116,3	0
<b>B: Tempo</b>	0,525312	1	0,525312	15759,38	0,0001
<b>C: Temperatura</b>	0,389701	1	0,389701	11691,03	0,0001
<b>AB</b>	0,006613	1	0,006613	198,38	0,005
<b>AC</b>	0,177013	1	0,177013	5310,38	0,0002
<b>BC</b>	0,234613	1	0,234613	7038,38	0,0001
<b>Lack-of-fit</b>	0,797349	2	0,398675	11960,24	0,0001
<b>Erro puro</b>	6,67E-05	2	3,33E-05		

R<sup>2</sup> = 89,42%

Para representar os resultados de açúcares redutores foi feito um gráfico do tipo cubo (Figura 2) apresentando os dados gerados pelo modelo avaliado (Equação 1). Nas condições



**Tab. 6.** Parâmetros ideais para obtenção de hidrolisados enzimáticos de outros resíduos agroindustriais, determinados por diferentes autores.

Resíduo agroindustrial	Enzima	Concentração da Enzima (%)	Condições de Hidrólise	Referências
Casca uva	1-Beta-glicosidase 2-Pectinase 3-Celulase	1-2,1 mg / g 2-5mg / g 3-2 mg / g	45 ° C	Wilkins, et. al, 2007
Casca de laranja	1-Pulzyme HA 2-Celluclast 1.5 L 3-β-galactosidase	1-3.4mg/g 2-3.4 mg/g 3-0.6 mg/g	50 °C /48 h	Tsukamoto, et. al, 2013
Casca de banana	1- Celulase 2-Xilanase 3- β-glicosidase 4-Complexo enzimático 5-β-glucanase e Xilanase	1-5,0 (% m/m) 2-0,25(% m/m) 3-0,6 (% m/m) 4-0,4(% m/m) 5-2,0 (% m/m)	50°C / 24 h pH 5,5	Ferreira,2013

A produção de etanol da linhagem PE-2 utilizando o hidrolisado enzimático da casca de pupunha resultou em aproximadamente 12,9 g/L de etanol (72hs de fermentação). Nesse estudo, foi observado um rendimento de 0,15 g / g de conversão de açúcares redutores em biomassa ( $Y_x/s$ ), e uma boa produtividade em etanol de 0,18 g / L / h. Santana, 2007 investigou a hidrólise do amido da mandioca por diferentes fontes enzimáticas e obteve hidrolisados entre 39,1 e 48,9 g de etanol/L. Oberoi e colaboradores, 2011, hidrolisaram casca da banana (9 FPU/g de celulase e 75 IU/g de pectinase sob 40 °C por 20 hrs) e obtiveram 28,2 g/L de etanol após a fermentação do hidrolisado. Com isso, pode-se observar que a fermentação realizada a partir dos hidrolisados enzimáticos da casca da pupunha foi satisfatória.

No presente trabalho, nas condições experimentais, a A: Concentração da Celluclast® 1.5 L, B: Tempo e C: Temperatura e todas as interações desses fatores apresentaram significado estatístico na hidrólise da casca da pupunha. Desse modo, novos estudos de otimização deverão levar em consideração a concentração desses três fatores. De acordo com o modelo gerado, a máxima concentração de açúcares redutores foi obtida quando se utilizou os níveis Celluclast® 1.5 L1233,4 UI/g, tempo de 59,75 min e temperatura de 51,2°C. No trabalho com o hidrolisado enzimático da casca de arroz de Reyes et. al, 1988 foram obtidos 0,54 mg/L de glicose sob condições parecidas de pré – tratamento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (v/v) e hidrólise ( 251U de celulase, 1h e 50

°C) as que foram empregadas no tratamento 4. Pode se observar que, a casca de pupunha liberou, após sacarificação com a enzima celulase, maior teor de açúcares do que o trabalho destacado.

Quanto às limitações do presente estudo, deve-se destacar: a) os açúcares redutores foram quantificados espectrofotometricamente utilizando-se o reagente de DNS, no entanto, análises por CLAE poderiam resultar em maior conhecimento sobre a composição dos hidrolisados; b) Não foram realizadas investigações quanto à influência do tamanho da casca de pupunha e também sobre o pH.

Com a realização desse estudo foi possível obter um bioprocesso capaz de produzir açúcares fermentescíveis a partir da sacarificação da casca de pupunha. Essa última apresentou-se como um substrato alternativo eficiente para a produção de bioetanol e a caracterização de monômeros dos resíduos estudados pode dar origem a novos estudos sobre os resíduos da região amazônica.

## **Agradecimentos**

À agência de fomento FAPEAM e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

## 5 REFERÊNCIAS

- ARAPOGLOU, D., VARZAKAS, T., VLYSSIDES, A. & ISRAILIDES, C. (2010). **Ethanol production from potato peel waste (PPW)**. *Waste Management*, 30: 1898–1902.
- AKPONAH, E.; AKPOMIE, O. O. (2011). **Analysis of the suitability of yam , potato and cassava root peels for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae***. *International Research Journal of Microbiology*, v. 2, n. November, p. 393–398.
- BAYITSE, R., HOU, X., BJERRE, A. B., & SAALIA, F. K. (2015). **Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars**. *AMB Express*, 5(1), 1-7.
- BISHAI, M., SINGH, A., ADAK, S., PRAKASH, J., ROY, L., & BANERJEE, R. (2016). **Enzymatic Peeling of Potato: A Novel Processing Technology**. *Potato Research*, 1-11.
- FERREIRA, Juliana. **Produção de levana e bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 93 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013.
- MILLER, G. L. *Analytical Chemistry*. 31, 426 (1959)
- OBEROI, H.S., VADLANI, P.V., SAIDA, L., BANSAL, S. & HUGHES, J.D. (2011). **Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process**. *Waste Management*, 31: 1576–1584.
- RATTANACHOMSRI, U; TANAPONQPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L; CHAMPEDRA, V. (2009) **Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis***. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 107, n. 5, p. 488–93, maio.
- REYES, J. PERALTA-ZAMORA, P. DURAN, N. **Enzymatic hydrolysis of rice hull using cellulases. Effect of chemical and photochemical treatments**. *Quimica Nova*, 21 (1998), pp. 140–143.
- SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. (Tese Mestrado)**. Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- SIVAMANI, S.; BASKAR, R.; NADU, T. (2014) **Optimization of Bioethanol Production From Cassava Peel Using Statistical Experimental Design**. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. v. 00, n. 00, p. 1–8.
- TSUKAMOTO, JUNKO, DURÁN, NELSON, & TASIC, LJUBICA. (2013). **Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(9), 1537-1543.
- WILKINS, M. R., WIDMER, W. W., GROHMANN, K., & CAMERON, R. G. (2007). **Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes**. *Bioresource Technology*, 98, 1596–1601.

ZIMMERMANN HW Studies on the dicromate method of alcohol determination. **Am. J. Enol. Viticulture**; 14: 205-213 ,1963.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho teve como principais objetivos investigar a obtenção e a composição de hidrolisados obtidos por via ácida e enzimática, selecionar qual dos hidrolisados é mais adequado para a produção de bioetanol e partir do hidrolisado selecionado, investigar quais as condições ótimas para a obtenção deste e para a produção do bioetanol. Na primeira parte deste trabalho, caracterizámos quanto a monômeros, furfural e hidroximetilfurfural todos hidrolisados ácidos dos resíduos estudados: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), caroço de açaí (*Euterpe oleracea*) e casca da raiz de macaxeira (*Manihot esculenta*) (capítulo 1). Observamos também a presença de inibidores na caracterização sem e com destoxificação por carvão ativo. Nesta parte do trabalho, o substrato com maior teor de açúcares foi conduzido à fermentação e otimização da hidrólise. A fermentação dos hidrolisados foi realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2. Para a otimização do processo de obtenção do hidrolisado ácido, foi realizado um delineamento experimental para avaliar a influência do tempo de hidrólise, Razão g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g de casca e da razão sólido-liquido necessárias para a obtenção de um hidrolisado com maiores concentrações de açúcares e menores níveis de furfural. Os resultados obtidos mostram que entre os hidrolisados ácidos dos resíduos amazônicos, a casca da pupunha possui bons níveis de glicose 56,55 g L<sup>-1</sup>. E também que esses açúcares oriundos da hidrólise têm potencial fermentativo, pois após o processo de fermentação o hidrolisado ácido da pupunha produziu 29,2 g/L de etanol e cerca de 3 g/L de biomassa. Através da otimização dos parâmetros da hidrólise concluímos que para a máxima produção de açúcares e suportáveis teores de furanos as concentrações ótimas para o hidrolisado ácido da casca de pupunha foram: Razão 0,63 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g de casca e Razão de 0,1707 sólido-liquido. No trabalho de Woiciechowski, 2002 envolvendo a otimização da hidrólise ácida do bagaço da mandioca, a melhor reação ocorreu a partir de 100 g desse resíduo com ácido a 1 % sob 120 °C por 10 minutos obtendo 62,4 g de açúcares redutores, em condições próximas o hidrolisado de pupunha obteve 25 g de açúcares redutores. Todavia, foi observado em suas condições ótimas de hidrólise o resíduo da pupunha pode gerar até 48,93 g de açúcares fermentescíveis (Razão 0,63 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g de casca e Razão de 0,1707 sólido-liquido). Este hidrolisado, também apresentou o maior teor do composto tóxico furfural (21,6 mg/L<sup>-1</sup>). No trabalho com o bagaço de cana de Aguilar et. al, (2002) as condições ótimas encontradas foram 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 122 °C por 24 min, com produção de 0.5 g furfural, valor superior ao encontrado neste trabalho. Mostrando que o valor encontrado nesse estudo não interfere na fermentação do hidrolisado da casca de pupunha.

Na segunda parte do trabalho (Capítulo 2), caracterizamos os hidrolisados enzimáticos dos mesmos resíduos estudados no capítulo anterior, e estudamos o potencial fermentativo do substrato com maior teor de açúcares, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). Os resultados obtidos indicam que a casca de pupunha novamente possui o melhor nível de açúcares redutores 26,3 g L<sup>-1</sup>. Após processo de fermentação, o hidrolisado ácido da pupunha produziu 12,9g/L de etanol e cerca de 5 g/L de biomassa. Ainda no capítulo 2, verificamos a melhor concentração da enzima Celluclast® 1.5 L em diferentes concentrações, tempo e temperatura, como resultado verificamos que para a melhor produção de açúcares a partir do hidrolisado enzimático da casca de pupunha as concentrações encontradas no planejamento foram de 1223,4 U/g de enzima Celluclast® 1.5 L, 51,2 °C e 59,75 minutos de hidrólise, esse tratamento apresentou o melhor desempenho, liberando 3,24 g de açúcares de casca de pupunha. Estes resultados, são superiores aos estudo realizados com outros resíduos como o realizado com casca de batata que obteve 7.85 mg/ml a partir das seguintes condições : enzima Celulase 56.29 IU/ml, Xilanase 270.22 IU/ml e Amilase 8655.49 IU/ml, combinadas na proporção 1:1 ,tempo de hidrólise de 4 h a 60 °C e pH 6.0 (Bishai e colaboradores, 2016). E o trabalho com o hidrolisado enzimático da casca de arroz de Reyes et. al, (1988) onde foram obtidos 0,54 mg/L de glicose sob condições parecidas de pré – tratamento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (v/v)) e hidrólise (251U de celulase, 1h e 50 °C).Em conclusão, esse estudo apresentou resultados satisfatórios ao demonstrar o potencial dos hidrolisado ácidos e enzimáticos da casca da pupunha como substrato para a produção de bioetanol.

## 5 CONCLUSÃO

- O resíduo mais susceptível a hidrólise ácida e hidrólise enzimática foi o mesmo: a casca da pupunha.
- Os açúcares redutores gerados pela hidrólise ácida e hidrólise enzimática da casca da pupunha puderam ser fermentados por via alcóolica.
- Nas condições experimentais, a razão  $H_2SO_4$ /casca de pupunha e a razão sólido/líquido apresentaram significativa influência positiva na obtenção de açúcares redutores nos hidrolisados ácidos.
- A concentração da enzima Celluclast® 1.5 L, a temperatura e tempo de hidrólise apresentaram significativa influência positiva na obtenção de açúcares redutores nos hidrolisados enzimáticos.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Determinação do teor alcoólico – NBR 13920. São Paulo: ABNT, 1997c.
- AGU, R. C.; AMADIFE, A. E.; UDE, C. M.; ONYIA, A.; OGU, E. O.; OKAFOR, M.; EZEJIOFOR, E. **Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production.** Waste Management (New York, N.Y.), v. 17, n. 1, p. 91–96, 1997.
- AGUSTINI, D.; JUNIOR, H. E. **Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural.** Synergismus Scyentifica, v. 02, p. 2–5, 2007.
- AKPONAH, E.; AKPOMIE, O. O. **Analysis of the suitability of yam , potato and cassava root peels for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*.** International Research Journal of Microbiology, v. 2, n. November, p. 393–398, 2011.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* ( Willd . ex . Spreng .) Schum ., por marcadores microsatélites e descritores botânico-agronômicos.** 2002. 159p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**, 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comercio de Livros Ltda., 2005.
- ANDRADE, J. S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R. N. **Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, p. 34–38, 2003.
- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis.** 15.ed. Washington: AOAC, 1990.
- AQUINO, A. **Estudos da cinética da deterioração dos frutos do açaizeiro.** Trabalho de conclusão de curso de licenciatura em Química. Belém-Pa, UFPA, 1999.
- ARAPOGLOU, D., VARZAKAS, T., VLYSSIDES, A. & ISRAILIDES, C. 2010. **Ethanol production from potato peel waste (PPW).** Waste Management, 30: 1898–1902.
- ARREDONDO, H.I.V. **Avaliação exergética e exergo-ambiental da produção de biocombustíveis.** Tese de doutorado da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- BALAT, M.; BALAT, Havva; Öz, Cahide. **Progress in bioethanol processing.** Progress in Energy and Combustion Science, v.34, pp. 551–573, 2008.
- BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review.** Energy Conversion and Management, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F; BARRETO, A. C.; SILVA, J. D. da; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M. **Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel.** Acta Amazonica, v. 39, n. 2, p. 371–376, 2009.

BARROS, M. A. **Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para produção de etanol.**Dissertação (Mestrado).Universidade Federal de Urbelândia, 2011.

BASTOS, V. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias.** BNDES Setorial, p. 5–38, mar. 2007.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER. F. **Farinha de varredura de mandioca (*Manihot esculenta*) na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, n.2, p.545-551, 2002b.

BOVI, M. L. A.; BASSO, L. C.; TUCCI, M. L. S. **Avaliação da atividade “in vivo” da fosfatase ácida e do crescimento de progênies de pupunheira cultivadas em duas doses de nitrogênio e fósforo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 22, n. 3, p. 427–434, 1998.

CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; ALVES, R. M.; NAZARÉ, R. F. R. de **Cupuaçuzeiro.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa. Belém, PA. p. 1–3, 2004.

CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora*) e acerola (*Malpighia glabra* L.).** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos),Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 87 p, 1991.

CHAAR, J.**Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e conservação de seu néctar por meios físicos e químicos.**Dissertação (Mestrado),Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,78p, 1980.

CLARICE MANHÃ. **Comida jogada no lixo em Manaus daria para alimentar 100 mil pessoas.** D24AM, 2014.Disponível em:new.d24am.com. Acesso: 20 de Setembro de 2014.

COHEN, K. D. O.; JACKIX, M. D. N. H. **Estudo do liquor de cupuaçu.**Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, n. 1, p. 182–190, 2005.

CONAB.Companhia Nacional de Abastecimento.**Cana de Açúcar.**Disponível em: < [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_08\\_09\\_39\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf) > Acesso em: 10 ago. 2013. 2013. p. 1–19, 2014.

DANIEL, G.; **FEMS Microbiology Reviews.** 1994, 13, 199.

DE SOUSA, J. L.U; MONTEIRO; R.A.B. **Fatores interferentes na fermentação alcoólicapara a produção de etanol.**FAZU em Revista, Uberaba, n. 8, p. 100-107, 2011

DEMİRBAŞ, A. **Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass.**Energy Sources, v. 27, n. 4, p. 327–337, 2 fev. 2005.

DIDONET, A.A.; FERRAZ I.D.K. **Comercio de frutos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey) nas feiras de Manaus, (Amazonas, Brasil).**Revista Brasileira de Fruticultura. , Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 353-362, Junho 2014.

DWIVEDI, P.; ALAVALAPATI, J. R. R.; LAL, P. **Cellulosic Ethanol Production : Status of Conversion Technologies in the United States Cellulosic feedstock composition.** Energy for Sustainable Development, 13 (2009), pp. 174–182 2009.

EZEKIEL, O.; AWORTH, O. C.; PREEZ, J. C. du; STEYN, L. **Cultivation of *Candida utilis* on Cassava Peel Hydrolysates for Single-cell Protein Production.**Journal of Food Science and Engineering, v. 2, p. 452–461, 2012.

FAO. **Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos : ejemplos de América Latina.** Roma, 241 p.1987.

FERREIRA, M. DAS G.; NOGUEIRA, A.; DAMIAO FILHO, C. **Estudo morfológico de folhas de cupuaçu(*Theobroma grandiflorum* Schum.).**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Rondonia, v. 33, 2006.

FERREIRA, R.; RODRIGUE, A.; CATARINO, A. **Utilização do resíduo orgânico da casca de mandioca no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo.** Cadernos de Agroecologia, v. 6, n. 2, p. 2–6, 2011.

FERREIRA, S. A.; GENTIL, D. F. **Extração , embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* ).** Acta Amazonica, v. 36, n. 2, p. 141–146, 2006.

FERREIRA, S. M.; CALIARI, M.; JÚNIOR, M. S. S.; BELEIA, A. D. P. **Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz.** Revista brasileira de produtos agroindustriais, v. 15, n. 62, p. 383–390, 2013.

FULTON, L.; HOWES, T. **Biofuels for transport: an international perspective.**International Energy Agency, Paris, France, 2004.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. **The sustainability of ethanol production from sugarcane.** Energy Policy, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

HICKERT, L.R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras.** Dissertação (Mestrado). Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea.** Embrapa in ed. Campinas. p. 23, 2009.

KIM, S.; DALE, B. **Ethanol Fuels: E10 or E85 – Life Cycle Perspectives (5 pp).** **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 11, p. 117–121, 2006.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos Avançados, v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010.

LABORATORIO DE AMBIENTE MARINHO E TECNOLOGIA (LAMTEC). **Energias Renováveis: Biocombustíveis Líquidos**, 2009. Disponível em: <http://www.lamtec-id.com/energias/biocombustiveis.php>. Acesso: 09 de Novembro de 2014.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos*. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 199-217, 2002.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. Dissertação do curso de Pós-graduação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, Brasil, 2013.

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

MACHADO, C. M. M. ; ABREU, F. R. "**Produção de álcool combustível a partir de carboidratos**". *Revista de Política Agrícola*, v. 15, p. 64-82, 2007.

MALHEIROS, S. M. P. **Avaliação do processo de compostagem utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP, Campinas, 1996.

MANO, E. B.; SEABRA, A. P. *Práticas de química orgânica*. São Paulo: Ed. Edart, 1969.

MARTINEZ A, RODRIGUEZ M.E., YORK S.W., PRESTON J.F., INGRAM L.O. (2000) **Use of UV absorbance To monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass**. *Biotechnology Progress*. 16:637.41.

MATIAS, G.; SANTOS, D. O. S. **Contribuição da Vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos no potencial antioxidante de produtos comerciais de açaí e cupuaçú**. Dissertação (Mestrado). Universidade federal do Ceará, 2007.

MATOS, C. B. **Caracterização física, química, físico-química de cupuaçus (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng) Schum.) com diferentes formatos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

METZLER, A. B.; CAMPOS, M. M.; PIEDRA, M. F.; MORA-URPÍ, J. **Pejibaye palm fruit contribution to human nutrition**. *Principes*, v. 36, n. 2, p. 66–69, 1992.

MICHEL, Â. C. S. **Produção Biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. Dissertação (Mestrado). Instituto de ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

MILLER, G. L. *Analytical Chemistry*. 31, 426 (1959)

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA) — **Clima e Energia** -Disponível em: <http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis> - Acesso: 18/12/14.

MIRANDA, I. P. DE A. **Frutos das palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT INPA, 2001. p. 120

MORAES, J. E. DE. **Valor nutritivo e formas de utilização do resíduo de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes*) para ruminantes**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Zootecnia, 2011.

MOREIRA, J. R. Obtenção de etanol a partir de material celulósico. In: Rosillo-Cale, F.; Bajay, S. V.; Rothman, H. (ed.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: UNICAMP, 2005. 448p.

NASCIMENTO, W. M. O. DO; CICERO, S. M.; NOVENBRE, A. D. D. L. C. **Conservação de sementes de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Revista Brasileira de Sementes, v. 32, p. 24–33, 2010.

NUNES, R. DE M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. **Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil**. Revista Liberato, v. 14, p. 113–238, 2013.

NUWAMANYA, E.; CHIWONA-KARLTUN, L.; KAWUKI, R. S.; BAGUMA, Y. **Bio-ethanol production from non-food parts of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**. Ambio, v. 41, n. 3, p. 262–70, maio 2012.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MADI, R. L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J. P. **Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 6, p. 3422–9, mar. 2010a.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MADI, R. L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J. P. **Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 6, p. 3422–9, 24 mar. 2010b.

OBEROI, H.S., VADLANI, P.V., SAIDA, L., BANSAL, S. & HUGHES, J.D. 2011B. **Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process**. Waste Management, 31: 1576–1584.

OLIVEIRA, E. N. A. DE; SANTOS, D. DA C. **Processamento e avaliação da qualidade de licor de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)** Processing and quality evaluation of açai liqueur (*Euterpe oleracea* Mart.). Rev Inst Adolfo Lutz, v. 70, n. 4, p. 534–41, 2011.

OLIVEIRA, M. DO S.; CARVALHO, J.; NASCIMENTO, W. **Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52p

OLSSON L, JØRGENSEN H, KROGH KBR, ROCA C. **Bioethanol production from lignocellulosic material**. In *Polysaccharides*. New York: Marcel Dekker Incorporated. 2004. p. 957-993

PEIXOTO, A. B.; ALMEIDA, N. A. DE; FILHO, F. M. **Bioetanol de fonte amilácea produzido por leveduras silvestres**. Revista de Biotecnologia & Ciência, v. 2, p. 25–39, 2013.

PEREIRA, S. C. L. **Estudo comparativo de álcool utilizando a *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava - PR. 2014.

PIETROBON, V.C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 2008

RAGAUSKAS, A.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK JR., W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The Path Forward for Biofuels and Biomaterials.** Science. vol 311 .27 de Janeiro de 2006.

RAMOS, S.; MACÊDO, J. L. V. de; LOPES, S. S; RAMOS, L. F. F. **Técnicas para facilitar a germinação das sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer).** Manaus: Embrapa, 2009. p. 1–6

RATTANACHOMSRI, U; TANAPONQPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L; CHAMPEDRA, V. **Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*.** Journal of bioscience and bioengineering, v. 107, n. 5, p. 488–93, maio 2009.

RODRIGUES B.S. **Resíduos da agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais.** Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação.** Belém: EDUFPA, 1ª ed.p. 313,2000.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. **Valorização de resíduos da Agroindústria.** II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, v. I, p. 98–105, 2011.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** Revista do BNDES. 32: 117-156.2009.

SALLA, D. A.; FURLANETO, F. P. B.; CABELLO, C; KANTHACK, R. A. D. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental, v. 333, n. 68, p. 444–448, 2010.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd Ex Spreng.)]. In: ALVES, E. R.; FILGUEIRAS, H. A. .; MOURA, C. F. H. (Eds.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina.** 9 ed. ed. Jaboticaba: FUNEP, 2000. p. p.31–34.

SHIKIDA, P. F. A.; PEROSA, B. B. **Álcool combustível no Brasil e path dependence.** Revista de Economia e Sociologia Rural, Piracicaba, v. 50, n. 2, p. 243-262, abr./ jun. 2012

SIVAMANI, S.; BASKAR, R.; NADU, T. **Optimization of Bioethanol Production From Cassava Peel Using Statistical Experimental Design.** Environmental Progress & Sustainable Energy.v. 00, n. 00, p. 1–8, 2014..

SOUZA AGC, SANTOS ÁF. **Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha na amazônia**. Embrapa Amazônia Ocidental,CPAA. 1996;173p.

SOUZA, O.; SCHULZ, M. A.; FISCHER, G. A. A.; WAGNER, T. M.; SELLIN, N. **Energia alternativa de biomassa: Bioetanol a partir da casca e da polpa de banana**.Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental, v. 16, n. 47, p. 915–921, 2012.

SOUZA, A. D. G. C. DE; SILVA, S. E. L. da; TAVARES, A. M.; RODRIGUES, M. do R. L. **A cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Embrapa Amazônia Ocidental, v. 1999, n. 92, p. 39, 1999.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Hidrólise do amido**. In: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo:. v. 3p. 377–445, 2003.

SZWARC, A. (2010). Etanol - **Carros flex: uso de etanol já evitou emissão de mais de 83 milhões de toneladas de CO2**. UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em <http://www.unica.com.br/noticias>. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

TAYLOR, M. P. **Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second-generation bioethanol production**. Trends in Biotechnology. Vol.27 No.7. 2009.

TEXEIRA, Brito Leopoldo. et al **Compostagem: Lixo orgânico urbano e resíduo da agroindústria do açaí**. Embrapa Amazônia Oriental, Albras, 1. ed. Belém: Albras. 2006. 21-23 página.

UNICA(2008) - **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil**. Disponível em <http://www.unica.com.br/noticias>. Acesso em 24 de janeiro de 2015.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, P. **Fermentação alcoólica de raízes tropicais**. In: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: [s.n.]. v. 3p. 531–573.

WBC (Worthington Biochemical Corporation) 2016, **Cellulase**. Acesso em 05/02/2016.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. **Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol**. Process Biochemistry, v. 42, n. 12, p. 1614–1619, dez. 2007.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; TEIXEIRA, A.P.; LOPES, T.M.;YUYAMA, K.;FAVARO, D.I.T.; VASCONCELOS, M.B. **Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer): quais os constituintes nutricionais?** Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim.Nutr.,v.30, supl., p. 332, 2005.

ZEOULA LM, NETO SFC, BRANCO AF, DO PRADO IN, DALPONTE AO, KASSIES M,; FREGADOLLI, F. L.; SANTOS, G. T. **Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial**. Revista Brasileira Zootecnia.

## 7 ANEXOS

**Fig. 1** Perfil cromatográfico do hidrolisado ácido da casca de pupunha.