



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ
(*Euterpe oleraceae* Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Márcio de Andrade Cordeiro

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ
(*Euterpe oleraceae* Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Márcio de Andrade Cordeiro

Orientador: Prof. Dr. Eng. Nélio Texeira Machado

Orientador Externo: Dr. Eng. Ossalin de Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Pós-Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal do Pará, como parte dos
requisitos para obtenção de título de Mestre em
Engenharia Química, área de concentração
Desenvolvimento de Processos.

Belém-PA
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFPA

Cordeiro, Marcio de Andrade, 1976-

Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí
(euterpe oleraceae mart) para a produção de etanol /
Marcio de Andrade Cordeiro. - 2016.

Orientador: Nélcio Teixeira Machado;

Coorientador: Ossalin de Almeida.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,
Belém, 2016.

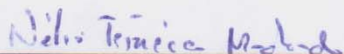
1. Enzimas. 2. Hidrólise. 3. Etanol. 4. Açaí.
I. Título.

CDD 22. ed. 660.634

Membros da Banca Examinadora para a Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato **Márcio de Andrade Cordeiro** junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

Márcio de Andrade Cordeiro

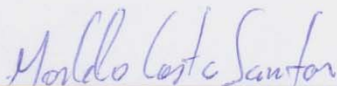
**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ
(*Euterpe oleraceae* Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**



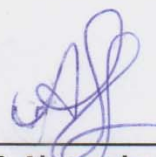
Prof. Dr. Eng. Nélcio Texeira Machado
PPGEQ-UFPA (Orientador)



Dr. Eng. Ossalim de Almeida
PPGEQ-UFPA (Co-Orientador Externo)



Prof. Dr. Marcelo Costa Santos
UFPA (Membro Externo)



Profa. Drª. Alessandra Santos Lopes
FEA-UFPA (Membro Externo)

A Deus e à Virgem Maria, por serem minha fortaleza, a meus familiares que sempre apoiaram, incentivaram para a elaboração do mesmo. Em particular à minha esposa pelo incentivo e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo direcionamento em todos os momentos de minha vida.

A Universidade Federal do Pará, pela oportunidade desta realização pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Dr. Nélio Teixeira Machado, pela orientação, Confiança, ajuda e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Ossalin de Almeida, pela co-orientação, confiança, críticas, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelo espaço e fornecimentos dos reagentes para a realização das análises necessárias para a produção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto (FF-ICEN-UFPA), pelo empréstimo do espectrofotômetro IV-UV e pelo fornecimento de reagentes e solventes.

A minha esposa e ao meu filho, pela compreensão e apoio, apesar da distância e ausência de minha parte durante este período.

Aos meus irmãos Herlom e Heider, pelo apoio e incentivo e aos momentos de alegrias que passamos juntos durante este período.

A minha mãe Carmem, pelo amor, pela compreensão e por todo apoio e incentivo durante esses anos de estudo e dedicação.

A todos meus familiares, tios, tias, primos, primas e sobrinhos, pois fizeram com que estes dois anos de estudos que passei longe de esposa e filho, não se tornassem uma eternidade, e que me proporcionaram momentos inesquecíveis, no decorrer de mais uma etapa em minha vida.

Ao colega Inaaldo Cláudio, responsável pelo laboratório de microscopia eletrônica de varredura (PRODERNA-ITEC), pelas análises de MEV/EDS.

As alunas Brenda Chagas e Sílvia Nayara (FQ-ICEN-UFPA), bolsistas de iniciação científica, que de alguma forma contribuíram com informações e dados para a elaboração do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

A FAPESPA, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O aproveitamento do caroço de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart), com fins energéticos tem sido pouco estudado, por tanto buscou-se nesse trabalho estudar a produção de etanol de segunda geração a partir da hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* e tratado com solvente em duas condições de temperaturas (60 e 70 °C). A enzima utilizada neste estudo β -glucosidase, conforme especificações técnicas (Tabela 5). As amostras do caroço de açaí, passaram por lavagem, secagem à temperatura ambiente, e em estufa com circulação de ar a 105 ± 5 °C, até peso constante, moagem e tratamento com solvente. O teor de umidade e o rendimento em base úmida do caroço de açaí "*in natura*" foi de 39,59 e 60,41%. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), permitiu fazer uma análise da estrutura e da presença de elementos químicos (C, O, Si e Al) no caroço e na fibra. O extrato etanoico do caroço de açaí apresentou capacidade satisfatória (82%) para sequestrar radicais livres (atividade antioxidante), frente ao radical livre DPPH. Como resultados do processo de hidrólise enzimática, o caroço de açaí sem tratamento (CANT60) mostrou ser uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol de segunda geração, por conter um alto teor de celulose (40,29%), além de apresentar bons rendimentos na liberação de glicose ($13,687 \text{ g.L}^{-1}$) após a hidrólise enzimática. Os teores médios de cinzas para CANT e CAT foram de 0,15 e 0,13%. No tratamento com solvente do caroço de açaí, na conversão de celulose em glicose, o rendimento ficou abaixo de 25%, nas duas condições de temperaturas (60 e 70 °C), pois não foi capaz de desestruturar a parede vegetal da biomassa, em especial, celulose, hemicelulose e lignina, tornando os açúcares fermentescíveis disponíveis no processo de hidrólise enzimática, devido aos possíveis inibidores gerados no tratamento. Mediante a análise dos dados experimentais, podemos dizer que a melhor condição da hidrólise enzimática do caroço de açaí foi o CANT60 e que a glicose obtida pela hidrólise enzimática do caroço de açaí foi bem assimilada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol.

Palavras-chave: Caroço de açaí, hidrólise, etanol.

ABSTRACT

The use of Acai seed (*Euterpe oleracea* Mart), for energy purposes has been little studied, therefore we sought in this work to study the production of second generation ethanol from enzymatic hydrolysis of core açai in natura and treated with solvent two temperature conditions (60 to 70 °C). The enzyme β -glucosidase used in this study as technical specifications (Table 5). The Açai core samples, passed through washing, drying at ambient temperature, in an oven with air circulation at 105 ± 5 °C until constant weight, grinding and solvent treatment. The moisture content and the yield on a wet basis of acai core "*in natura*" was 39.59 and 60.41%. Morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM), allowed to analyze the structure and the presence of chemical elements (C, O, Si and Al) in the core and fiber. The -ethanoic acid extract of acai seed showed satisfactory capacity (82%) to scavenge free radicals (antioxidant activity), against free radical DPPH. As a result of the enzymatic hydrolysis process, the core acai without treatment (CANT60) proved to be a promising lignocellulosic biomass to obtain second generation ethanol, it contains a high cellulose content (40.29%), besides presenting good income in the release of glucose (13.687 g L^{-1}) after enzymatic hydrolysis. The average ash content for CANT and CAT were 0.15 and 0.13%. Treatment with acai core of the solvent in the conversion of cellulose into glucose, the yield was below 25%, in both temperature conditions (60 to 70 °C), it was not able to disrupt the plant wall biomass in particular cellulose, hemicellulose and lignin, making fermentable sugars available on the enzymatic hydrolysis process, because of possible inhibitors generated during the treatment. By analyzing the experimental data, we can say that the best condition of enzymatic hydrolysis of acai core was CANT60 and glucose obtained by enzymatic hydrolysis of acai seed was well assimilated by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production.

Keyword: Core of açai, hydrolysis, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do fruto do açaizeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Endocarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Pericarpo + Tegumento e (6) Mesocarpo	33
Figura 2. Estrutura lignocelulósica de uma biomassa vegetal evidenciando um esqueleto de celulose circundado por hemicelulose e lignina	37
Figura 3. Estrutura molecular da celulose	38
Figura 4. Representação esquemática da organização das cadeias de celulose	39
Figura 5. Componentes da fração hemicelulose	39
Figura 6. Estrutura dos álcoois, (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico precursores da lignina.....	41
Figura 7. Representação esquemática da estrutura das fibras lignocelulósicas	41
Figura 8. Histórico da produção de açúcar e álcool no Brasil	45
Figura 9. Rotas tecnológicas para produção de etanol de primeira e segunda geração	46
Figura 10. Diferentes pré-tratamentos para a produção de bioetanol	48
Figura 11. Processos globais de hidrólise e fermentação de celulose e hemicelulose	49
Figura 12. Energia de ativação para uma reação de $A \rightarrow B$ com e sem catalisador.	53
Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco	57
Figura 14. Fluxograma simplificado para a obtenção de etanol do caroço de açaí...	59
Figura 15. (1) Hidrolisado do caroço de açaí ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$) e (2) reator batelada....	70

Figura 16. Curva de secagem do caroço de açaí ($T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{ar} = 0,5\text{ m.s}^{-1}$)	73
Figura 17. Curva granulométrica do caroço de açaí.....	74
Figura 18. Avaliação do potencial antioxidante do CAEtOH pelo método DPPH (0,3 mM, $t = 30\text{ min}$).....	76
Figura 19. Micrografias do corte transversal caroço de açaí (mesocarpo). Ampliação de 500x (1) e ampliação de 1,2k (2)	77
Figura 20. Micrografias do perfil longitudinal fibra do caroço de açaí. Ampliação de 300x (1) e ampliação de 1,2k (2)	78
Figura 21. Espectros de EDS do corte transversal do mesocarpo do caroço de açaí <i>in natura</i>	78
Figura 22. Espectros de EDS da fibra (perfil longitudinal) do caroço de açaí <i>in natura</i>	79
Figura 23. Atividade enzimática (método das diluições)	80
Figura 24. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (Tubo de ensaio, $C_0 = 40\text{ g.L}^{-1}$)..	81
Figura 25. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CANT60 ($C_0 = 40\text{ g.L}^{-1}$).....	84
Figura 26. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CAT60 ($C_0 = 40\text{ g.L}^{-1}$)	84
Figura 27. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CANT70 ($C_0 = 40\text{ g.L}^{-1}$).....	85
Figura 28. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CAT70 ($C_0 = 40\text{ g.L}^{-1}$)	85
Figura 29. Representação da curva cinética da hidrólise enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70).....	89
Figura 30. Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da cinética enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70)	91
Figura 31. Ordem de Reação das cinéticas enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade produzida e participações relativa e acumulada do açaí (fruto), dos 20 maiores municípios produtores e respectivas Unidades da Federação, em ordem decrescente (IBGE, 2014)	35
Tabela 2. Diferenças entre hemicelulose e celulose	40
Tabela 3. Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática.....	48
Tabela 4. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida.....	50
Tabela 5. Atividade da enzima, densidade, pH, temperatura e dosagem recomendada	60
Tabela 6. Composição média do caroço de açaí (g/100 g em base seca).....	75
Tabela 7. Análise química semi-quantitativa do mesocarpo do caroço de açaí <i>in natura</i> (corte transversal).....	79
Tabela 8. Análise química semi-quantitativa da fibra do caroço de açaí <i>in natura</i> (perfil longitudinal)	80
Tabela 9. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 60 °C, V _T = 250 mL, pH = 4,8)	83
Tabela 10. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 70 °C, V _T = 250 mL, pH = 4,8)	83
Tabela 11. Fermentação alcoólica do hidrolisado do CANT60 (T = 33 ± 1 °C, 24 h)	86
Tabela 12. Parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática do caroço de açaí	87

NOMENCLATURA E SÍMBOLOS

CA	Caroço de Açaí
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
CANT	Caroço de Açaí <i>in natura</i>
CAT	Caroço de Açaí Tratado com Solvente
CAEtOH	Extrato Alcólico do Caroço de Açaí
CANT60	Caroço de açaí <i>in natura</i> hidrolisado na temperaturas de 60 °C
CAT60	Caroço de açaí tratado com solvente hidrolisado na temperaturas de 60 °C
CANT70	Caroço de açaí <i>in natura</i> hidrolisado na temperaturas de 70 °C
CAT70	Caroço de açaí tratado com solvente hidrolisado na temperaturas de 60 °C
nm	Namômetro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PEVS	Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura
N_T	Nitrogênio Total
P_B	Proteína Bruta
ART	Açúcares Redutores Total
EDS	Energia Dispersiva com Detector de Raio-X
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Mm	Milimol
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
μM	Micromol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CAH	Extrato Hexânico do Caroço de Açaí
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
AOAC	Métodos de Análise Oficiais
BSE	Elétrons Secundários Retroespalhadas
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA E SÍMBOLOS	xi
SUMÁRIO.....	29
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	29
1.1 INTRODUÇÃO	29
1.2 OBJETIVOS	30
1.2.1 Objetivo Geral	30
1.2.2 Objetivos Específicos.....	30
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	32
2.1 AÇAÍ	32
2.1.1 Descrição Botânica	32
2.1.2 Ecologia	33
2.1.3 Produção Anual	34
2.2 BIOMASSA.....	36
2.2.1 Biomassa Lignocelulósica.....	36
2.2.1.1 Celulose	38
2.2.1.2 Hemicelulose	39

2.2.1.3	Lignina	40
2.2.1.4	Extrativos	42
2.3	ENZIMAS.....	42
2.3.1	Celulases	43
2.4	ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	44
2.4.1	Pré-Tratamentos	46
2.5	HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	49
2.5.1	Hidrólise Enzimática.....	49
2.6	FERMENTAÇÃO	51
2.6.1	Microrganismos Envolvidos na Fermentação de Etanol	51
2.7	CINÉTICA ENZIMÁTICA	52
2.7.1	Teoria de Michaelis-Menten (AULT, 1974)	54
2.7.2	Lineweaver-Burk	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	MATERIAIS	60
3.1.1	Enzima	60
3.1.2	Matéria-Prima	60
3.2	MÉTODOS	60
3.2.1	Tratamento do Carço de Açaí (CA).....	60
3.2.1.1	Moagem	61
3.2.1.2	Distribuição do tamanho da partícula.....	61

3.2.1.3	Tratamento com solvente.....	61
3.2.2	Caracterização do CA.....	62
3.2.2.1	Umidade.....	62
3.2.2.2	Voláteis	62
3.2.2.3	Cinzas	62
3.2.2.4	Carbono fixo.....	62
3.2.2.5	Lipídeos	63
3.2.2.6	Proteínas bruta (Método de Kjeldahl).....	63
3.2.2.7	Fibras	63
3.2.2.8	Celulose e Hemicelulose.....	64
3.2.2.9	Lignina Insolúvel (Klason - TAPPI, 1999).....	64
3.2.3	Avaliação da Atividade Antioxidante	65
3.2.4	Potencial Hidrogeniônico (pH)	66
3.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura//Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV/EDS)	66
3.2.6	Hidrólise Enzimática.....	66
3.2.6.1	Determinação da atividade enzimática	66
3.2.6.2	Açúcares redutores totais (ART).....	68
3.2.6.3	Hidrólise enzimática do caroço do açaí.....	68
3.2.6.4	Ensaio preliminares de hidrólise	68
3.2.6.5	Ensaio de hidrólise enzimática.....	69

3.2.7	Fermentação Alcóolica.....	70
3.3	AJUSTES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DO CA	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	TRATAMENTO DO CAROÇO DE AÇAÍ.....	73
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO CAROÇO DE AÇAÍ	74
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	75
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA/ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (MEV/EDS).....	77
4.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA TOTAL.....	80
4.6	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	81
4.6.1	Estudo Comparativo da Hidrólise Enzimática do Caroço de Açaí.....	82
4.7	FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.....	85
4.8	CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ.....	87
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	95
5.1	CONCLUSÕES	95
5.2	RECOMENDAÇÕES	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE I - DADOS DA SECAGEM DO CAROÇO DE AÇAÍ EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR ($T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, VELOCIDADE DO AR DE $0,5\text{ M.S}^{-1}$).....	108
	APÊNDICE II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE GLICOSE I	109
	APÊNDICE III – MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	112

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se em posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas, pelo fato de ser um dos maiores potenciais de matérias-primas renováveis do planeta, pela grande disponibilidade de culturas agrícolas de grande extensão. Neste contexto, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo responsável por 37% de toda a produção mundial (ÚNICA,2009).

Dentre todas as utilizações possíveis para biomassa, a geração de energia pode ser considerada a mais expressiva. Em efeito, a sua combustão constituiu tradicionalmente a fonte de energia mais importante desde o descobrimento do fogo, e teve uma participação significativa até a Revolução Industrial, quando outras fontes alternativas de energia foram disponibilizadas, de forma a acompanhar o surto do desenvolvimento e a respectiva demanda por produtos industrializados (INFANTE & VEIRAS, 2003).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO et al., 2008).

A hidrólise enzimática materiais lignocelulósicos é conduzida por celulasas, sendo que os dois maiores grupos de celulasas que estão envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases e exoglucanases (SUN & CHENG, 2002). As celulasas quebram a celulose em celobiose, que é subsequentemente clivada à glicose pela β -glucosidase (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). Em geral a hidrólise enzimática encontra-se associada a métodos de pré-tratamentos, que “abrem” o material e reduzem a recalcitrância da estrutura dos materiais lignocelulósicos com o objetivo de tornar a hidrólise eficiente (KARIMI et al., 2013).

Os métodos de pré-tratamentos incluem, métodos físicos (mecânicos ou térmicos), métodos químicos, métodos biológicos e, quando possível, a combinação de um ou mais métodos (TALEBNIA et al., 2010). Sendo cada vez mais comuns

estudos que se concentram em investigar os chamados métodos híbridos que incorporam as vantagens de diferentes pré-tratamentos (TAKARA & KHANAL, 2012).

O açaí (*Euterpe oleraceae* Mart), é um dos produtos de maior consumo da região norte do país do qual tem-se como resíduo, o caroço, que são considerados resíduos urbanos e, atualmente, se configuram como um enorme inconveniente ao bem-estar e higiene sanitária das cidades no norte do Brasil, como Belém (SILVA & ROCHA, 2003), onde esses caroços são jogados em terrenos baldios a céu aberto e que nos últimos anos tem se mostrado como um resíduo de processamento, para o qual foram desenvolvidas poucas alternativas tecnológicas para seu aproveitamento.

A possibilidade de converter o resíduo obtido após o processo de obtenção da polpa do açaí em etanol de 2ª geração, utilizando a enzima β -glucosidase, seria interessante do ponto de vista comercial e principalmente ambiental, pois toneladas dessa biomassa deixariam de ser descartadas a céu aberto e teriam um destino que é a produção do bioetanol de 2ª geração (autor).

Poucos estudos para o aproveitamento do caroço com fins energéticos são relatados na literatura, dentre os quais se destaca a queima do resíduo, para produção de energia. No entanto, este processo de queima é caracterizado como um processo de baixo valor agregado e, a princípio, ecologicamente incorreto. Além disso, há poucos relatos até o momento do aproveitamento do caroço de açaí, sendo aproveitado como biomassa para a produção de etanol de 2ª geração (autor), o que motivou para a realização deste trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a produção de etanol de segunda geração a partir da hidrólise do caroço de açaí.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização do caroço de açaí *in natura*;
- Realizar a caracterização do caroço de açaí tratado com solvente;

- Realizar hidrólises enzimáticas do caroço de açaí *in natura* e tratado com solvente em duas condições de temperaturas (60 e 70 °C);
- Avaliar o rendimento de açúcares liberados na etapa de hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* e tratado com solvente nas duas condições de temperaturas (60 e 70 °C);
- Determinar a melhor condição de hidrólise enzimática do caroço de açaí;
- Realizar a fermentação do hidrolisado do caroço de açaí obtido na melhor condição (*in natura* e/ou tratado com solvente) pela levedura comercial, *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar os índices de produtividade de etanol;
- Estudar a cinética enzimática pela equação Michaelis-Menten e a representação de Lineweaver-Burk.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 AÇAÍ

O açaí (*Euterpe oleracea*, Mart) pertencente à família Arecaceae, que engloba, aproximadamente, 200 gêneros e cerca de 2600 espécies, cuja distribuição é predominantemente nas áreas tropicais e subtropicais (JONES, 1995).

Embora na terminologia vulgar seja mais conhecida como açaí, outras denominações são de uso frequente nas áreas de ocorrência na Amazônia brasileira, porém de forma mais restrita, se destaca os seguintes nomes: açaí do Pará, açaí do baixo amazonas, açaí de touceira, açaí de planta, juçara e juçara de touceira (CALZAVARA, 1972; CAVALCANTE, 1991; VILLACHICA et al., 1996).

2.1.1 Descrição Botânica

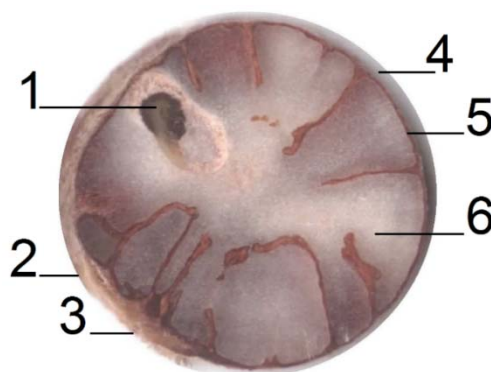
Palmeira cespitosa, com até 25 perfilhos (brotações) por touceira em diferentes estágios de desenvolvimento. As plantas adultas têm estipes de 3 a 20 m de altura e 7 a 18 cm de diâmetro. As folhas são compostas, pinadas com arranjo espiralado de 40 a 80 pares de folíolos. A inflorescência do tipo cacho possui flores estaminadas e pistiladas. A disposição das flores é ordenada em tríades, de tal forma que cada flor feminina fica ladeada por duas flores masculinas. O fruto do açazeiro é uma drupa globosa, de 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 gramas. O epicarpo, dependendo do tipo, é roxo ou verde na maturação.

O mesocarpo polposo (1 mm de espessura) envolve o endocarpo volumoso e duro que acompanha a forma do fruto e contém a semente em seu interior. Popularmente o que chamam de semente é o pirênio, pois a semente é ainda envolvida pelo endocarpo. A semente apresenta na maturação um endosperma sólido do tipo ruminado e um embrião pequeno, mas desenvolvido.

As plântulas apresentam dois a três primórdios foliares antes de apresentarem uma folha completa que é bífida. O sistema radicular é do tipo fasciculado, com raízes emergindo do estipe da planta adulta até 40 cm acima da superfície do solo (NASCIMENTO, 2008).

Principal subproduto da indústria de processamento do açaí, o caroço é uma semente oleaginosa, formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento, que na maturidade é rico em celulose (53,20%), hemicelulose (12,26%) e lignina (22,30%) (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008) e que mesmo após a remoção da polpa ainda apresenta elevados teores de celulose e hemicelulose (ALTMAN, 1956). Na Figura 1, é apresentada a anatomia do fruto do açaizeiro.

Figura 1. Anatomia do fruto do açaizeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Endocarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Pericarpo + Tegumento e (6) Mesocarpo



Fonte. Autor, 2016.

2.1.2 Ecologia

Populações naturais de açaí são encontradas em solos de igapó e terra firme, porém com maior frequência e densidade em solos de várzea. Em algumas áreas, principalmente na região do estuário do rio Amazonas (Pará), grandes áreas são cobertas quase que exclusivamente por açaizeiros (maciços). Estas áreas caracterizam-se por uma pluviosidade bem distribuída, superior a 2.000 mm anual e por poucos meses com precipitação mensal menor do que 60 mm.

Os açaizeiros sobrevivem períodos de inundação, característica que os tornam bastante competitivos e provavelmente dominantes em algumas áreas. A espécie é típica de floresta madura, cresce lentamente, necessita muita umidade, mas uma baixa exigência de luz, mesmo para o desenvolvimento das plântulas.

A dispersão das sementes pode ser feita por aves de médio a grande porte, roedores e mesmo pela água quando o local for susceptível às enchentes. Muitas plântulas não sobrevivem à competição principalmente intraespecífica. Após alcançar

1 m de altura ou 2 a 3 anos de vida, nota-se geralmente o início do crescimento do estipe (NASCIMENTO, 2008).

No sistema de Classificação de Cronquist (1981) o açaizeiro está ordenado na seguinte sequência hierárquica:

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Liliopsida*

Subclasse: *Arecidae*

Ordem: *Arecales*

Família: *Arecacea*

Subfamília: *Arecoideae*

Gênero: *Euterpe*

Espécie: *Euterpe oleracea* Mart.

O epíteto genérico é uma homenagem a *Euterpe*, deusa da mitologia grega (MARCHIORI, 1995) e traduzido do grego significa “elegância da floresta” (HODGE, 1965), em alusão à beleza da planta (STRUDWICK & SOBEL, 1986). O nome específico “*oleracea*” significa que parece ou exala odor semelhante ao do vinho, devido à cor e ao aroma da polpa, principalmente quando em início de fermentação.

2.1.3 Produção Anual

O Estado do Pará, principal produtor, participou com 55,4% da produção nacional de açaí extrativo, no ano de 2014, foi de 198.149 toneladas, representando um decréscimo de 2,0% em relação à de 2013. Completam este total os Estados do Amazonas (33,6%), Maranhão (7,0%), Acre (2,0%), Amapá (1,1%), Rondônia e Roraima (0,9%). Importante salientar que esta não é a produção total de açaí, cujo cultivo vem aumentando, porém, por se tratar de uma cultura permanente, não é acompanhada pela PEVS (IBGE, 2014).

Em 2014, houve mudança do principal município produtor, sendo que a primeira colocação coube a Limoeiro do Ajuru (PA), seguido por Codajás (AM); Oeiras (PA); Itacoatiara (AM); e Muaná, Mocajuba, Inhangapi, Ponte de Pedras, Afuá e São Sebastião da Boa Vista (PA) (IBGE, 2014).

Na Tabela 1 são apresentados os 20 maiores municípios produtores de açaí que concentram 70,2% da produção nacional.

Tabela 1. Quantidade produzida e participações relativa e acumulada do açaí (fruto), dos 20 maiores municípios produtores e respectivas Unidades da Federação, em ordem decrescente (IBGE, 2014)

Municípios produtores e respectivas Unidades da Federação	Qtde Produzida [t]	Participação [%]	
		Relativa	Acumulada
Brasil	198.149	100,0	-
Limoeiro do Ajuru-PA	26.500	13,4	13,4
Codajás-AM	25.000	12,6	26,0
Oeiras do Pará-PA	12.000	6,1	32,0
Itacoatiara-AM	7.500	3,8	35,8
Muaná-PA	6.905	3,5	39,3
Mocajuba-PA	6.600	3,3	42,6
Inhangapi-PA	6.200	3,1	45,8
Ponta de Pedras-PA	6.158	3,1	48,9
Afuá-PA	6.125	3,1	52,0
São Sebastião da Boa Vista-PA	5.891	3,0	54,9
Igarapé-Miri-PA	4.700	2,4	57,3
São Miguel do Guamá-PA	4.280	2,2	59,5
Lábrea-AM	3.500	1,8	61,2
Magalhães Barata-PA	3.000	1,5	62,8
São Domingos do Capim-PA	2.850	1,4	64,2
Manacapuru-AM	2.600	1,3	65,5
Manicoré-AM	2.460	1,2	66,8
Anori-AM	2.446	1,2	68,0
Luís Domingues-MA	2.257	1,1	69,1
Humaitá-AM	2.188	1,1	70,2

Fonte. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2014

O caroço de açaí nos últimos anos tem se mostrado como um resíduo de processamento, para o qual foram desenvolvidas poucas alternativas tecnológicas de aproveitamento. Esse resíduo se tem apresentado como um transtorno ambiental para as cidades do norte do Brasil, principalmente Belém e Manaus (SILVA & ROCHA, 2003) e ainda continua assim nos dias de hoje.

2.2 BIOMASSA

Conjunto de materiais orgânicos gerados por organismos autótrofos do reino vegetal (fito massa) ou acumulados nos seres heterótrofos do reino animal (zoomassa). Os organismos fotossintéticos (autótrofos) são capazes de transformar a energia solar em energia química, mediante a atuação biogeoquímica dos cloroplastos contidos na clorofila das plantas. Essa energia é retida e acumulada nos espaços intermoleculares e é liberada em processos que envolvem oxidação, redução e hidrólise, que podem ser de natureza termoquímica, bioquímica e biológica (COELHO, 1982).

Dentre todas as utilizações possíveis para biomassa, a geração de energia pode ser considerada a mais expressiva. Em efeito, a sua combustão constituiu tradicionalmente a fonte de energia mais importante desde o descobrimento do fogo, e teve uma participação significativa até a Revolução Industrial, quando outras fontes alternativas de energia foram disponibilizadas, de forma a acompanhar o surto do desenvolvimento e a respectiva demanda por produtos industrializados (INFANTE & VEIRAS, 2003).

Segundo VÁSQUEZ et al. (2007), a tendência de estudos é desenvolver processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração.

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO et al., 2008).

2.2.1 Biomassa Lignocelulósica

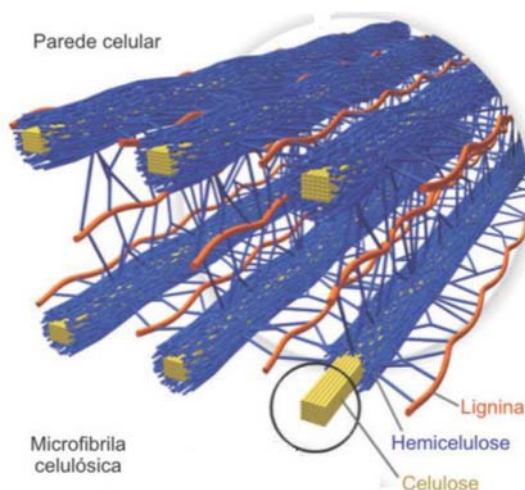
As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para produção de etanol, bem como para outros

biocombustíveis. Esses materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol devido a sua disponibilidade e baixo custo (MARTÍN et al., 2007; KUMAR & MURTHY, 2011), além disso, seu uso reduz a emissão de carbono para a atmosfera, são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997). Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER et al., 2002).

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose que é uma matriz amorfa que age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas, sendo esta, basicamente, um esqueleto que é circundado pela hemicelulose e pela lignina que dá certa rigidez, estando todos intimamente associados entre si, conforme apresentado na Figura 2. A participação desses constituintes na biomassa varia muito de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo, dentro da mesma espécie. Este fato é observado quando são analisadas partes diferentes do vegetal (MILEO, 2011).

Figura 2. Estrutura lignocelulósica de uma biomassa vegetal evidenciando um esqueleto de celulose circundado por hemicelulose e lignina



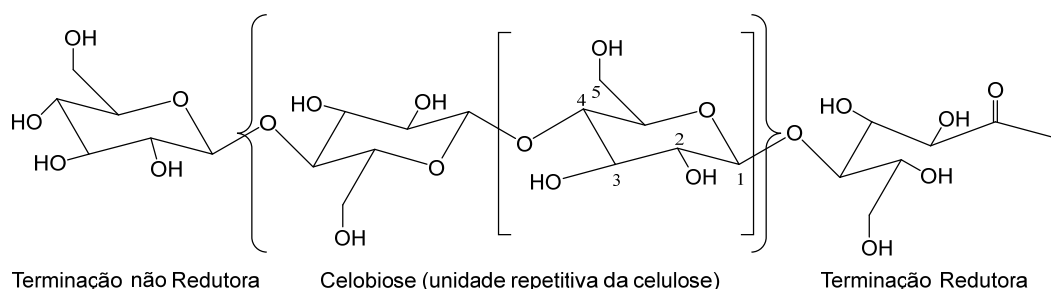
Fonte. Adaptado de CANILHA et al., 2010.

As tecnologias para a obtenção de bioetanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação. Para executar essa tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA Jr. et al., 2008). Desta maneira, faz-se necessário conhecer a estrutura e as principais características dos principais componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

2.2.1.1 Celulose

A celulose (23 a 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um polímero linear que possui como unidade básica de repetição a celobiose, um dímero de glicose, e tem como função dar proteção, forma e suporte às células vegetais (Figura 3). As cadeias de celulose são constituídas por camadas unidas por forças de Van der Waals, sendo que em sua estrutura que contém unidades de β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio da mesma molécula (intramoleculares) e entre os grupos de hidroxila das moléculas adjacentes (intermoleculares) (PIETROBON, 2008).

Figura 3. Estrutura molecular da celulose



Fonte. Adaptado de KLEMM et al., 2005.

É devido às suas fortes ligações de hidrogênio que a celulose possui estrutura rígida e é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (CARVALHO, 2011). A organização das cadeias de celulose forma regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas (Figura 4), sendo que a região cristalina é fortemente

organizada conferindo resistência e proteção contra a degradação externa, e a região amorfa não possui uma organização molecular, tornando-a mais susceptível à degradação externa (FENGEL & WENEGER, 1989).

Figura 4. Representação esquemática da organização das cadeias de celulose



Fonte. Adaptado de GURGEL, 2010.

2.2.1.2 Hemicelulose

Por sua vez, a fração hemicelulósica (15 a 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldo pentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, e deoxiexoses (Figura 5). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA et al., 2009).

Figura 5. Componentes da fração hemicelulose

PENTOSE	HEXOSE	ÁCIDOS HEXURÔNICOS	DEOXIEXOSE
β -D-xilose	β -D-glucose	Ácido β -D-glucurônico	α -L-ramanose
α -D-arabinopirranose	β -D-manose	Ácido α -D-4-metilglucurônico	α -L-ramanose
α -L-arabinosefuranose	β -D-galactose	Ácido α -D-galactorônico	

Fonte. MORAIS, 2005.

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SUN & CHENG, 2005).

A Tabela 2, apresenta as principais características da celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é de fundamental importância para a definição das estratégias de aproveitamento das biomassas como matérias-primas para a produção de bioetanol e de outras substâncias químicas.

Tabela 2. Diferenças entre hemicelulose e celulose

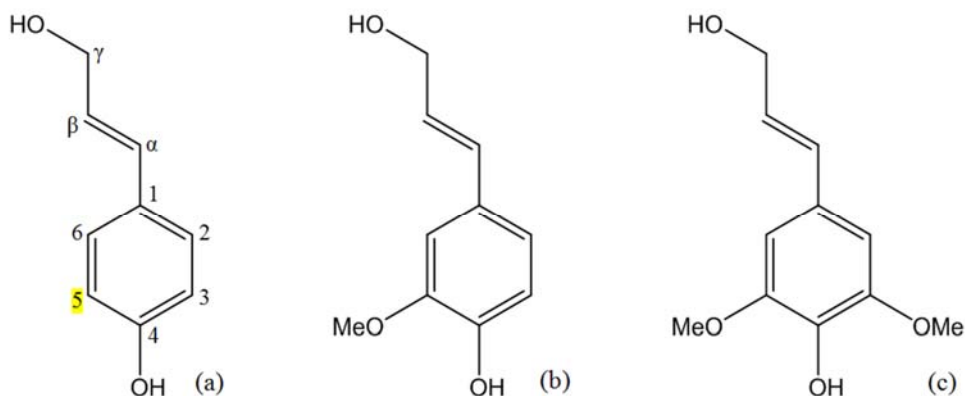
CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose)	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É insolúvel em álcalis	É solúvel em álcalis

Fonte. PEREIRA Jr. et al., 2008.

2.2.1.3 Lignina

A estrutura bioquímica da fração lignina (10 a 30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Sendo assim a lignina possui uma elevada massa molecular, e é formada a partir da junção de vários ácidos e álcoois fenilpropílicos (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (Figura 6) (JIMÉNEZ, 2009).

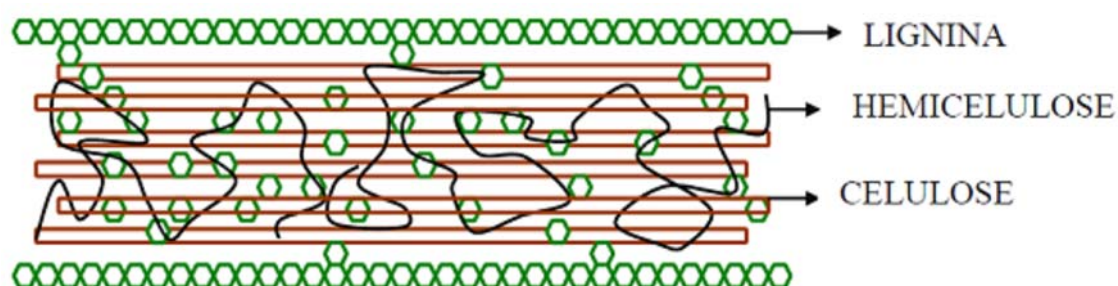
Figura 6. Estrutura dos álcoois, (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico precursores da lignina



A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a autossuficiência e, eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente. Naturalmente, essa situação é positiva tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência por recursos energéticos fósseis externos (PEREIRA Jr. et al., 2008).

O grau de solubilidade da lignina varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidro líticas empregadas. A interação entre lignina, celulose e hemicelulose, determina a estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática da estrutura das fibras lignocelulósicas



Fonte. MUSSATO, 2010.

2.2.1.4 Extrativos

Os extrativos são compostos orgânicos da biomassa vegetal e podem ser extraídos em solvente orgânico ou em água (SANTOS, 2008). Dentre os extrativos dos materiais lignocelulósicos mais comuns encontram-se ácidos graxos, ceras, Terpenos, óleos essenciais, compostos aromáticos (aldeídos, ácidos, álcoois, flavonoides, quinonas) e sacarose residual. Estes compostos existem na forma de monômeros, dímeros e polímeros, podendo agir como inibidores nos processos de conversão de biomassa (WOLF, 2011).

A presença dos extrativos ocorrerá em diferentes tipos e concentrações de acordo com a parte da planta que está sendo analisada e que podem incluir: cascas, folhas, frutos e sementes (FENGEL & WEGENER, 1989; ROWEL et al., 2000). De acordo com Baudel (1999), os extrativos interagem com reagentes utilizados nos processos de hidrólise e deslignificação da biomassa, bem como na quantificação da lignina presente na mesma, acarretando resultados errôneos na caracterização do material.

Segundo Sluiter et al., (2010), estes componentes são facilmente extraídos com água ou solventes e na biomassa podem contribuir de forma significativa, em até 30% ou mais, para o fechamento do balanço de massa, o que poderá interferir com a subsequente caracterização dos carboidratos e da lignina.

2.3 ENZIMAS

As enzimas são moléculas proteicas de alta massa molecular que atuam como catalisadores biológicos. São capazes de diminuir a energia de ativação (ordem de 10^{14}) requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto, aumentando a velocidade da reação sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre (SHULER, 1992; CAMPBELL, 2000; LEMOS, 2006).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que atuam. Estes grupos são: oxirredutases; transferases; hidrolases; liases; isomerases e ligases (SHULER, 1992).

As enzimas hidrolases são extensivamente utilizadas por vários segmentos industriais. Dentre as hidrolases podemos citar as enzimas celulasas, as quais são obtidas, principalmente, a partir de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. Seu uso industrial inclui: hidrólise enzimática: produção de glicose; tratamento de resíduos; indústria têxtil: remoção manchas, clarificação, desengomagem; indústria de alimentos: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, produção de agar; indústria de polpa, de papel, no tratamento de resíduos, fermentação e na produção de bioetanol (KIELING, 2002; CHAPLIN, 2004; CIB, 2004; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004; UFSC, 2004; ZHANG, 2006).

2.3.1 Celulasas

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. Segundo Lynd & Zhang (2002) e Peixoto (2006), tal complexo, oriundo de micro-organismos, animais e plantas, é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:

- Endoglucanases (EC 3.2.1.4): enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em moléculas menores. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor;
- Exoglucanases: enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs (EC 3.2.1.91), embora raras, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. As CBHs (EC 3.2.1.91) são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela morfogênese, que é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A morfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas;

- β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose. Em muitos estudos são utilizados substratos modelos para a determinação de celulose total e/ou para facilitar a diferenciação entre as atividades enzimáticas dos três tipos de enzimas como: algodão, papel de filtro, avicel, solka floc, celulose de algas, celulose bacteriana e celulose micro cristalina (MARTINS, 2005).

2.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

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

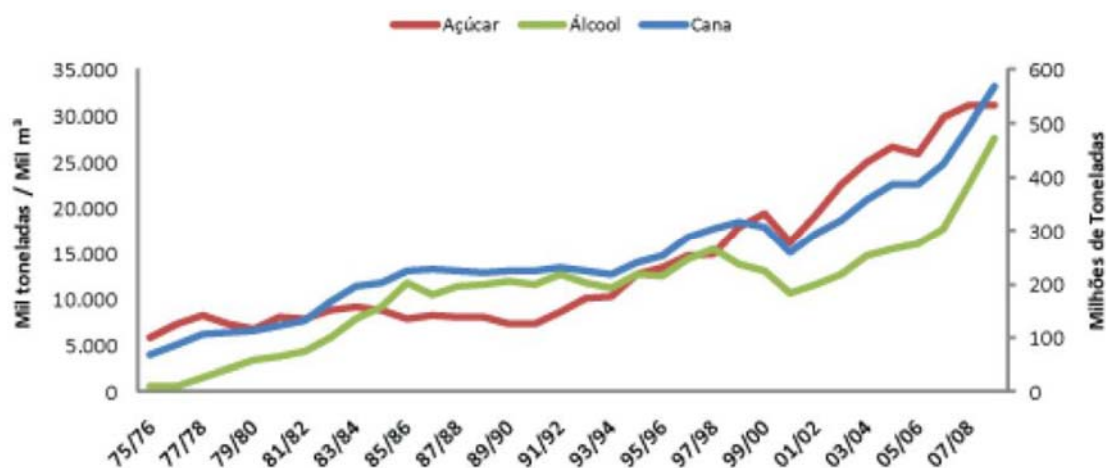
A motivação do governo para lançar o Proálcool foi respaldada no peso devastador da conta do petróleo na balança de pagamentos do país, que importava na época mais de 80% do petróleo que consumia (LEITE & LEAL, 2007), nesse período o preço do barril de petróleo triplicou devido principalmente às diversas crises do petróleo, sendo as duas mais graves ocorridas na década de 1970.

A queda de preço e a volta do fornecimento internacional de petróleo, fez com que a política de promoção do álcool no Brasil fosse sendo esquecida e somente após um período de estagnação de cerca de 15 anos é que a produção de etanol voltou a crescer novamente.

Rosa e Garcia (2009) comentaram que esse crescimento está ligado a dois fatores principais: a legislação de diversos estados norte-americanos que determinou em 2003 que o éter metil-ter butílico – MTBE, aditivo à gasolina que apresentava problemas ambientais, fosse substituído pelo etanol; e a introdução do etanol, no Brasil, igualmente em 2003, de veículos com motor flexfuel. Enquanto isso, o álcool sofreu influência da cana-de-açúcar que também estava ligada a produção do açúcar, sendo esse mercado inversamente proporcional a produção e comercialização do álcool, logo com o gradativo aumento na produção de cana desde o início da década

de 90 até meados de 2006, elevou-se a produção de açúcar no Brasil (PORTELA, 2011), como apresentado na Figura 8.

Figura 8. Histórico da produção de açúcar e álcool no Brasil



Fonte. ÚNICA, 2009.

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

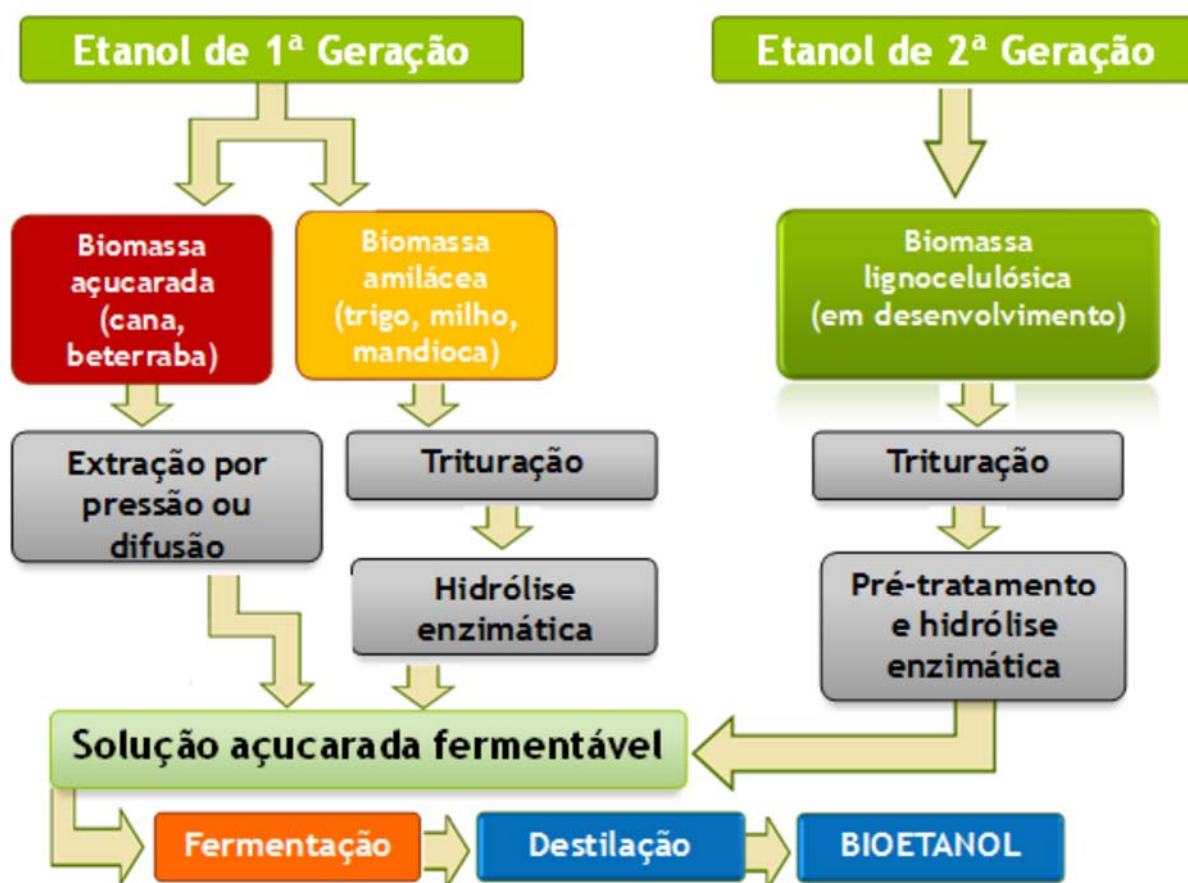
Atualmente, a produção de biocombustíveis convencionais defronta-se com sérias dificuldades para atingir os níveis desejados, o que constitui forte estímulo à adoção de tecnologias mais avançadas capazes de melhorar o desempenho da produção no setor, onde se destaca o etanol de segunda geração. Este tipo de etanol se diferencia do convencional por utilizar rotas ainda em desenvolvimento, especialmente com base em resíduos lignocelulósicos, chamado, também, de etanol lignocelulósico.

Dentre os resíduos utilizados, temos os resíduos agrícolas (palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de milho e arroz) e os resíduos florestais (pó e restos de serraria, pontas e galhos finos de espécies florestais nativas ou exóticas) se

destacando como fonte de maior interesse graças ao baixo custo destas matérias-primas (SILVA, 2010).

Na Figura 9, estão apresentadas as possíveis rotas para produção de bioetanol a partir de diferentes biomassas.

Figura 9. Rotas tecnológicas para produção de etanol de primeira e segunda geração



Fonte. Adaptado de BNDES & CGEE, 2008.

2.4.1 Pré-Tratamentos

A fermentação de açúcares fermentescíveis a etanol, ainda é seriamente restrita em função do fato de a digestibilidade da celulose presente nos materiais lignocelulósicos ser dificultada por sua característica físico-química, estrutura e composição, mas pode ser facilitada com etapas prévias de pré-tratamentos (ALVIRA et al., 2010; WANG et al., 2014).

Apesar dos materiais lignocelulósicos constituírem uma excelente fonte de açúcares hexoses (C6) e pentoses (C5), eles são considerados substratos complexos

constituídos basicamente de celulose e hemiceluloses recobertas por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando a micro fibrila celulósica, além de uma fração menor remanescente representada por minerais e extrativos (ADEN et al., 2002; RABELO, 2008; GÍRIO et al., 2010).

Essa estrutura complexa caracteriza a recalcitrância do material 28 lignocelulósico, e torna difícil a sua despolimerização em açúcares fermentescíveis por restringir a acessibilidade do material ao ataque enzimático (ADEN et al., 2002; PU et al., 2013).

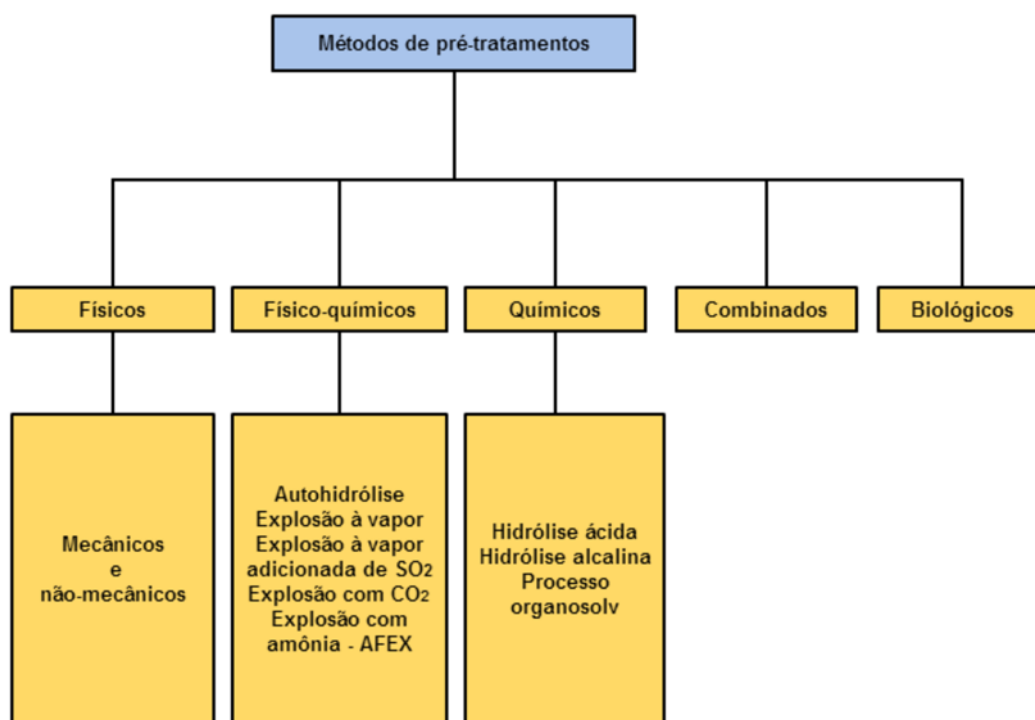
De modo geral, o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termo de rendimento, seletividade, funcionalidade (garantindo acessibilidade da celulose aos agentes hidro líticos), simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e atributos ambientais, enquanto consiste em reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades (BAUDEL, 2006).

Os principais objetivos do pré-tratamento são: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quanto na etapa de fermentação (HSU, 1996).

O pré-tratamento é essencial para a obtenção de resultados viáveis do ponto de vista econômico e tecnológico na produção de etanol (ROCHA et al., 2014). Os métodos de pré tratamentos utilizados devem ser adequados a cada tipo de biomassa, em função das suas diferentes características físico-químicas (KARAGÖZ et al., 2012).

Os métodos de pré-tratamentos incluem, métodos físicos (mecânicos ou térmicos), métodos químicos, métodos biológicos e, quando possível, a combinação de um ou mais métodos (TALEBNIA et al., 2010). Sendo cada vez mais comuns estudos que se concentram em investigar os chamados métodos híbridos que incorporam as vantagens de diferentes pré-tratamentos (TAKARA & KHANAL, 2012).

Na Figura 10, são apresentados os diferentes tipos de pré-tratamentos utilizados para a produção de etanol de segunda geração.

Figura 10. Diferentes pré-tratamentos para a produção de bioetanol

Fonte. Adaptado de SINGH et al., 2014.

Na Tabela 3, é possível verificar as principais características dos pré-tratamentos aplicados à biomassa.

Tabela 3. Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática

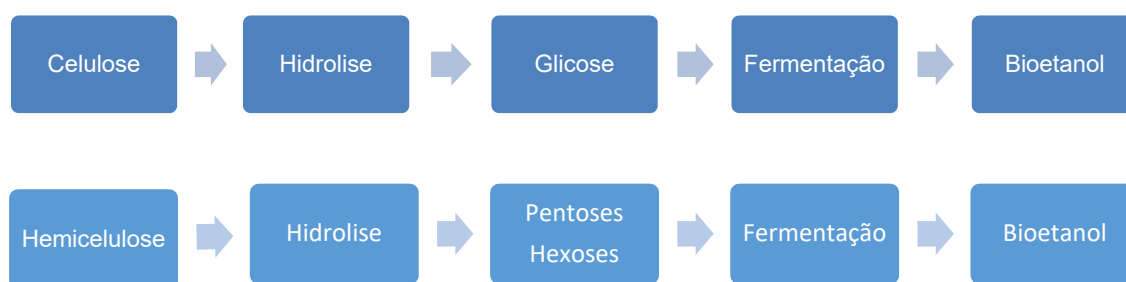
Métodos	Operações (fatores) que ocasionam mudanças na estrutura do substrato	Tipo de mudança	Referências
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons γ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólises e explosão a vapor).	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização.	AZUMA et al., 1985 KOULAS et al., 1992 RAMOS et al., 1993
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes orgânicos.	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumento da porosidade.	FARID et al., 1983, SZCZODRAK et al., 1986 BES et al., 1989
Biológico	Bolor branco (Pleurotus, Pycnoporus, Ischnoderma, Phlebia e etc.).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	ROLZ et al., 1986 MES- HARTREE et al., 1987
Combinado	Tratamento alcalino associado, com explosão a vapor, moagem acompanhada com tratamento alcalino ou tratamento ácido.	Degradação da hemicelulose, deslignificação, aumento da área superficial e tamanho dos poros.	PURI & PEARCE, 1989

Fonte. SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996.

2.5 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os polímeros de glucídios, presentes nos materiais lignocelulósicos, necessitam de ser convertidos em açúcares simples, antes do processo de fermentação, através de um processo denominado de hidrólise. A hidrólise (ou sacarificação) quebra as ligações de hidrogênio, e glicosídicas, nas fracções de hemicelulose e de celulose, reduzindo-as aos seus açúcares constituintes: pentoses e hexoses. Estes açúcares podem depois ser fermentados em bioetanol, enquanto que a lignina resulta num subproduto do processo (DEMIRBAS, 2005; TAHERZADEH & KARIMI, 2007), tal como se apresenta na Figura 11.

Figura 11. Processos globais de hidrólise e fermentação de celulose e hemicelulose



A etapa de hidrólise consiste na degradação das cadeias poliméricas da celulose em monômeros de glicose. Há dois principais tipos de hidrólise, a ácida e a enzimática. A ácida envolve um catalisador ácido e sua conversão é rápida, sendo necessário um minucioso controle da reação com o objetivo de evitar a formação de produtos indesejáveis e inibidores do processo. Na hidrólise enzimática o catalisador é de origem biológica, os quais possuem ações altamente específicas sendo necessário um controle específico do meio de reação (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006).

2.5.1 Hidrólise Enzimática

Em função da produção de etanol de segunda geração, têm-se dado maior atenção à eficiência e ao custo do processo de hidrólise enzimática, o qual é utilizado para conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos ou

fermentescíveis (LARABIA et al., 2013; AMIRI et al., 2014). No processo de sacarificação, são obtidos açúcares simples a partir de carboidratos complexos como amido, celulose, hemicelulose, pectina, entre outros (KARIMI et al., 2006).

O rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, o qual visa expor as cadeias de celulose; área superficial; cristalinidade; arranjo molecular; tamanho da partícula; porosidade do material; inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termo estabilidade das enzimas; concentração e adsorção do substrato; tempo de duração da hidrólise; pH do meio; temperatura; concentração de substrato e de enzima no meio, e taxa de agitação (SILVA, 2009). Em geral, no processo de obtenção do etanol de segunda geração, a hidrólise enzimática se encontra associada a métodos de pré-tratamentos, que alteram a estrutura da parede celular do material e reduzem a recalcitrância da estrutura dos materiais lignocelulósicos com o objetivo de tornar a hidrólise eficiente (KARIMI et al., 2013).

Quando realizada para materiais lignocelulósicos pode ser um processo lento, por ser prejudicada pelas características estruturais do substrato, tais como o conteúdo de lignina e hemicelulose, a área de superfície e a cristalinidade da celulose (ALVIRA et al., 2010). Em geral encontra-se associada a métodos de pré-tratamentos, que “abrem” o material e reduzem a recalcitrância da estrutura dos materiais lignocelulósicos com o objetivo de tornar a hidrólise eficiente (KARIMI et al., 2013).

A hidrólise enzimática pode ser realizada em processo simultâneo com a fermentação. Todavia, a diferença de temperatura entre os processos é um dos principais fatores que limitam a obtenção eficiente de produtos quando realizados em um mesmo processo (MARQUES et al., 2008). Segundo Krishna (2000) a hidrólise enzimática é superior à hidrólise ácida, em vários aspectos, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida

Parâmetro	Hidrólise ácida	Hidrólise enzimática
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200 °C)	Baixa (45 °C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do Processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte. KRISHNA et al., 2000.

2.6 FERMENTAÇÃO

A fermentação envolve a ação de microrganismos, que utilizam os açúcares como substrato. Durante o processo libertam etanol e outros subprodutos. Estes microrganismos utilizam tipicamente açúcares com 6 carbonos, sendo o mais comum a glicose. Assim, materiais lenho-celulósicos que contenham elevados níveis de glicose, ou precursores de glicose, são os mais facilmente convertíveis em etanol (DEMIRBAS, 2005).

A hidrólise da celulose produz glicose, a qual é facilmente fermentada pelos microrganismos atualmente disponíveis. A hidrólise da hemicelulose produz hexoses e pentoses: manose, galactose, xilose, arabinose e glicose, as quais nem todas são fermentáveis pelas estirpes existentes (DEMIRBAS, 2005).

2.6.1 Microrganismos Envolvidos na Fermentação de Etanol

Contrariamente à produção de bioetanol baseada na fermentação de sacarose ou amido, a produção de bioetanol a partir de materiais celulósicos se baseia na fermentação de uma mistura de açúcares, na presença de compostos inibidores (ácidos orgânicos de baixo peso molecular), derivados de furanos, compostos fenólicos e compostos inorgânicos, libertados e formados durante as etapas de pré-tratamento e de hidrólise das matérias-primas (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A utilização de materiais lenho-celulósicos como matéria-prima para a produção de bioetanol impõe, assim, requisitos exigentes aos microrganismos potenciais a ser utilizados no processo de fermentação alcoólica (ZALDIVAR et al., 2001).

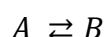
Os microrganismos para fermentação alcoólica podem ser descritos em termos da gama de parâmetros que condicionam a sua atividade (gama de temperaturas, gama de pH, tolerância ao álcool, produtividade, tolerância osmótica, especificidade enzimática, estabilidade genética e tolerância a inibidores), e de outros requisitos, tais como, compatibilidade com os produtos, processos e equipamentos existentes (DEMIRBAS, 2005).

2.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Enzimas são catalisadores de sistemas biológicos extremamente eficiente e específicos. Uma enzima acelera a velocidade de uma reação de aproximadamente um milhão de vezes, em comparação com a taxa de reação do mesmo na ausência da enzima. A maioria das reações biológicas não ocorrem a taxas perceptíveis na ausência de enzimas (NELSON & COX, 2000).

Uma das mais simples reações biológicas catalisadas por uma enzima é a hidratação do CO_2 . O catalisador nesta reação é anidrase carbônica. Esta reação é parte do ciclo de respiração, que expelle o CO_2 a partir do corpo. Anidrase carbônica é uma enzima altamente eficiente - cada molécula de enzima pode catalisar a hidratação de 10^5 moléculas de CO_2 por segundo (VOET & VOET, 1995).

As enzimas são altamente específicas, uma enzima em particular, catalisa apenas uma única reação química ou um conjunto de reações químicas e outras semelhantes, como é o caso de qualquer catalisador, as enzimas não alteram o ponto de equilíbrio da reação. Isto significa que a enzima acelera a reação para a frente e precisamente o reverso pelo mesmo fator. Por exemplo, considere a interconversão de A e B (NELSON & COX, 2000).



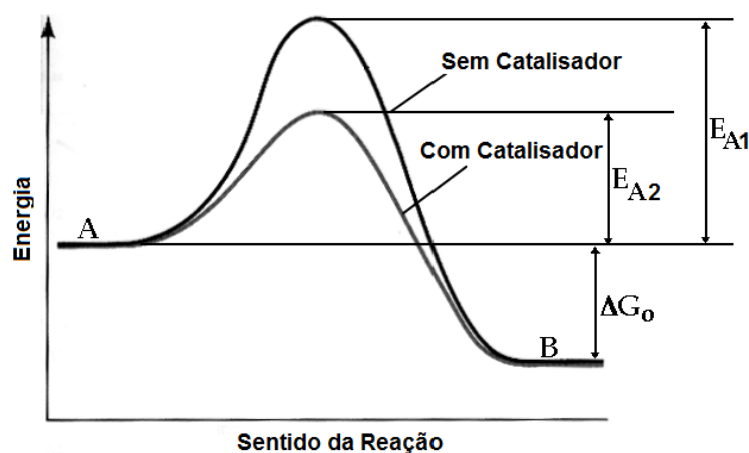
Suponhamos que, na ausência da enzima a constante de velocidade para a frente (K_1) é 10^{-4} s^{-1} e a constante de velocidade reversa (K_2) é de 10^{-6} s^{-1} . A constante de equilíbrio (K_{eq}) é dada pela razão das duas constantes de velocidade (ZUBAY et al., 1995).

$$K_{eq} = \frac{[B]}{[A]} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100 \quad (1)$$

No equilíbrio, a concentração da espécie B é 100 vezes maior do que a concentração da espécie A. No entanto, na ausência de uma enzima a reação pode demorar mais tempo para atingir o equilíbrio, enquanto que na presença de uma enzima, o equilíbrio pode ser atingido dentro de um segundo. A enzima reduz a altura

da barreira de energia para a reação, aumentando assim a velocidade da reação, uma vez que as taxas de reação nos dois sentidos são afetadas. A constante de equilíbrio não é afetada pela presença da enzima, como mostrado na Figura 12 (NELSON & COX, 2000).

Figura 12. Energia de ativação para uma reação de $A \rightarrow B$ com e sem catalisador



Fonte. Adaptado de Nelson & Cox, 2002.

Onde, E_{A1} e E_{A2} , são a energia de ativação para a reação no sentido de $A \rightarrow B$ na ausência e na presença de um catalisador e ΔG_0 , é a variação de energia livre para a reação.

A constante de equilíbrio relativa a ΔG_0 é:

$$K_{eq} = e^{\frac{-\Delta G_0}{RT}} \quad (2)$$

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG_0) e a constante de equilíbrio (K_{eq}), são iguais para as reações catalisada e não catalisada.

Uma razão para a eficiência e a especificidade de uma enzima é a forma como a enzima interage com a molécula reagente (substrato), em reacções catalisadas por enzimas. A enzima e o substrato interagem para formar um complexo enzima-substrato. As interações entre o substrato e o sítio ativo são fracas (interações não covalentes), isto é, o substrato não se liga de forma covalente ao sítio ativo, mas

fracamente interage com ele através de interações tais como, pontes de hidrogénio, interações de van der Waals, etc (NELSON & COX, 2000).

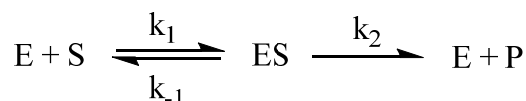
O mecanismo de reações catalisadas por enzimas é frequentemente estudado através de medições cinéticas em sistemas de reação da enzima-substrato. Estes estudos incluem a determinação das taxas das reações catalisadas por enzima a diferentes concentrações de substrato e da enzima (VOET & VOET, 1995).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, o microrganismo, os produtos do metabolismo e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura (SCHMIDELL et. al., 2001).

Os parâmetros cinéticos são usados para comparar as atividades das enzimas. As enzimas aumentam a velocidade em torno de 5 e 17 ordens de magnitude (NELSON & COX, 2002). A velocidade de uma reação enzimática é influenciada por diversos fatores, tais como, pH, temperatura, pressão, concentração de substrato, concentração de produto, presença de inibidores, concentração de enzimas, etc (GAMBARATO, 2010).

2.7.1 Teoria de Michaelis-Menten (AULT, 1974)

De acordo com a teoria de Michaelis e Menten, para uma reação enzimática com um único substrato, a enzima livre (E) e o substrato (S) estão permanentemente em equilíbrio com o complexo ES durante a reação:



A primeira parte da reação corresponde a uma simples dissociação, a segunda parte (a transformação de ES), será um processo muito mais lento do que aquela dissociação. A constante k_2 será muito mais baixa do que k_1 . Portanto, a velocidade de formação do produto (velocidade da reação enzimática, v) não estará dependente da velocidade de formação do complexo ES, mas apenas da taxa de decomposição deste complexo, isto é,

$$v = k_2[ES] \tag{3}$$

A constante de dissociação de ES (K_s), pode facilmente ser determinada a partir da Equação 4, pois corresponde ao inverso da constante de equilíbrio desta Equação, denominada de constante de Michaelis (K_m). Portanto será:

$$k_s = k_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (4)$$

A conjugação das Equações 3 e 4, permite obter a equação de Michaelis-Menten do seguinte modo:

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (5)$$

Substituindo $[E]$ na Equação 4, temos:

$$k_m = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} \quad (6)$$

Resolvendo a Equação 6, temos:

$$[ES] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{k_m + [S]} \quad (7)$$

Substituindo agora o valor de $[ES]$ na Equação 4, temos:

$$v = \frac{k_2 [E_T] \cdot [S]}{k_m + [S]} \quad (8)$$

Quando a concentração do substrato for muito elevada, todas as moléculas da enzima estarão ligadas a moléculas do substrato ($[E_T] = [ES]$, enzima saturada) e a enzima estará funcionando ao máximo da sua velocidade; portanto, do ponto de vista teórico, poderá escrever-se nessas condições, temos:

$$k_2 [E_T] = k_2 [ES] = V_{máx} \quad (9)$$

A equação de Michaelis-Menten é obtida com a substituindo a Equação 9 na Equação 8.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

A equação de Michaelis-Menten (Equação 10) relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração de substrato e a $V_{\max}$ pela constante K_m . Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante K_{cat} também chamada número de renovação (NELSON & COX, 2002).

A cinética foi introduzida para estudar as etapas de uma reação enzimática e os parâmetros experimentais mais importantes fornecidos pela cinética de estado estacionário que são o K_{cat} e o K_{cat}/K_m (NELSON & COX, 2002). O conhecimento da concentração de enzima permite uma boa medida de eficiência catalítica da relação k_{cat}/K_m e de $V_{\max}/K_m$. O limite sobre o valor de k_{cat}/K_m é ditada por k_1 . Este é controlada unicamente pela taxa de difusão do substrato ao sitio ativo da enzima. Este, por sua vez, está relacionada com a viscosidade do solvente. Isso limita o valor de k_1 de 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (MARANGONI, 2003).

A concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis (K_m), que é a característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. O valor de K_m é muito variável, para a maioria das enzimas, pois ela depende do tipo de substrato e em condições ambientais tais como pH, temperatura, força iônica, e polaridade, no entanto, ela situa-se geralmente entre 10^{-1} e 10^{-7} M (VANNICE, 2005). É importante lembrar que K_m é igual K_s apenas quando a ruptura do complexo ES ocorre muito mais lentamente do que a ligação do substrato para a enzima, ou seja, quando $k_{-1} \gg k_2$ (MARANGONI, 2003).

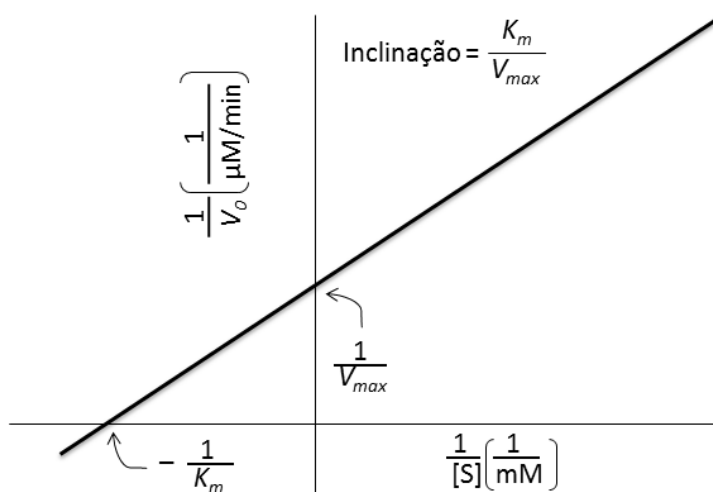
No modelo de equilíbrio de Michaelis e Menten, o passo de ligação ao substrato é assumido para ser rápido em relação à taxa de decomposição do complexo ES. Portanto, a reação de ligação de substrato é considerada no equilíbrio. A constante de dissociação de equilíbrio para o complexo ES (K_s) é uma medida da afinidade de enzima para o substrato e que corresponde ao substrato de concentração de $1/2 V_{\max}$ (MARANGONI, 2003).

A teoria/equação de Michaelis-Menten se aplica apenas a reações químicas catalisadas por enzimas com um só substrato. Contudo, a maioria das reações enzimáticas do metabolismo celular são reações com mais de um substrato. A cinética enzimática destas reações é consideravelmente mais complexa. Por este motivo, e apenas no caso das enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten, utiliza-se comumente um truque: satura-se a enzima relativamente a todos os seus substratos com exceção daquele que se pretende estudar, ficando assim a velocidade da reação dependente da concentração de um único substrato (NELSON & COX, 2002).

2.7.2 Lineweaver-Burk

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em equações que são mais úteis no tratamento gráfico dos dados cinéticos experimentais. A linearização da equação de Michaelis-Menten é uma representação dos duplos recíprocos mostrado na Figura 13, também chamada representação de Lineweaver-Burk (MARANGONI, 2003).

Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco



Fonte. Adaptado de Nelson & Cox, 2002.

Com a inversão da equação de Michaelis (Equação 10) se obtém a Equação 11, chamada de equação de Lineweaver-Burk.

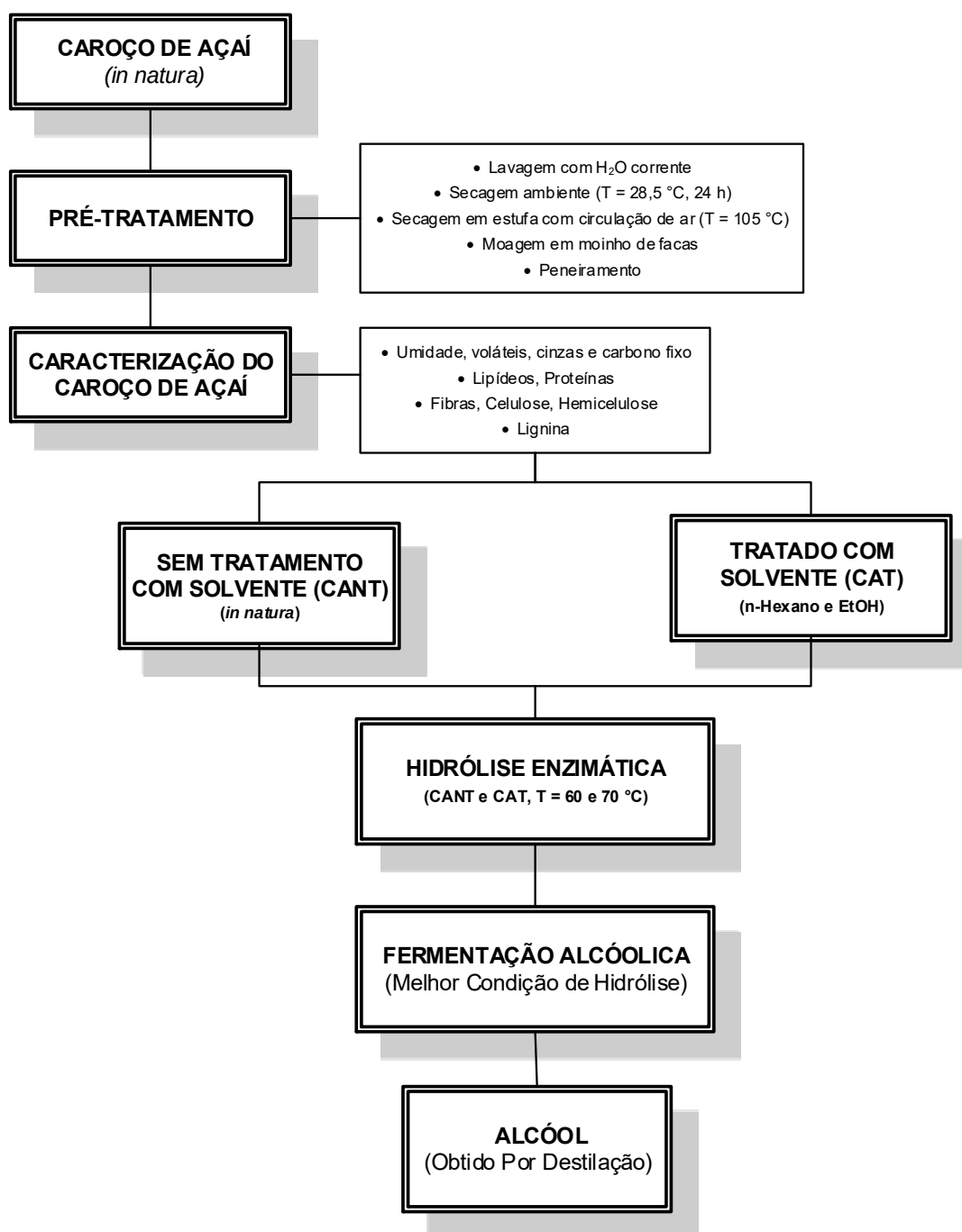
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (11)$$

Para as enzimas que obedecem a equação de Michaelis o gráfico de $1/V_0$ *versus* $1/[S]$ é representada por uma reta que permite que as estimativas iniciais de parâmetros cinéticos para que possam ser avaliadas como a interceptação $1/V_{\max}$ (coeficiente linear) e a inclinação $K_m/V_{\max}$ (coeficiente angular) e algumas transformações lineares, são realizadas para se chegar a estimativas das constantes cinéticas K_m e $V_{\max}$. O valor do ponto de intercepção entre a reta e o eixo x é uma extrapolação de dados experimentais obtidos em laboratório (SCHMIDELL et. al., 2001; MARANGONI, 2003; FREY & HEGEMAN, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O processo simplificado para a obtenção do etanol do caroço de açaí a partir da hidrólise enzimática é apresentado na Figura 14.

Figura 14. Fluxograma simplificado para a obtenção de etanol do caroço de açaí



Fonte. Autor, 2016.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Enzima

A enzima utilizada neste estudo correspondeu a preparação comercial β -glucosidase, também conhecida como celobiase (NS22118, Cellulosic Ethanol Enzyme Kit), cedida pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca), fornecida pela Novozymes Latin America (Araucária-PR, Brasil). As especificações técnicas sobre o produto são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade da enzima, densidade, pH, temperatura e dosagem recomendada

Enzima	Código	Atividade [CBU.g ⁻¹]	Densidade [g.mL ⁻¹]	pH	Temperatura [°C]	Dosagem [% m/m]
β -glucosidase	NS22118	750	1,2	2,5–6,5	45–70	0,2–0,6

Fonte. NOVOZYMES, 2010.

3.1.2 Matéria-Prima

As amostras do caroço de açaí (CA), *in natura*, foram obtidas em pontos de vendas localizado em feiras livres de Belém-PA (1°28'28.77"S e 48°28'19.22"W) no mês de junho de 2015. A coleta foi realizada logo após o despulpamento dos frutos para obtenção da polpa (suco) do açaí.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Tratamento do Caroço de Açaí (CA)

A preparação da amostra (CA) consistiu de lavagem com água corrente para a retirada dos resíduos da coleta e outras impurezas. Secagem ambiente ($T \approx 28,5$ °C) em meio absorvente para a remoção do excesso de umidade, durante 24 h. Após este período, o CA foi submetido a secagem em estufa com circulação de ar (MARCONI-035) a 105 ± 5 °C, até peso constante.

3.2.1.1 Moagem

O CA seco (6,0 kg) foi triturado em moinho de facas (WILLEY, Modelo WLS-3004) e acondicionado.

3.2.1.2 Distribuição do tamanho da partícula

A distribuição granulométrica do CA foi realizada em um agitador magnético de peneiras (BERTEL, Modelo 1868), durante 30 minutos com agitação de 15 rpm, tendo sido utilizadas peneiras da série padrão Tyler de 8, 10, 14, 28 e 48 mesh (MENTOR, Modelo RX-29-10). Para a determinação da fração mássica retida, foram realizados ensaios em triplicata. A percentagem retida foi calculada de acordo com a Equação 12.

$$\text{Massa Retida } [\%] = \left(\frac{D_{48}}{D_8 + D_{10} + D_{14} + D_{28} + D_{48}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Onde, D_8 , D_{10} , D_{14} , D_{28} e D_{48} , correspondem a abertura das peneiras [mm].

3.2.1.3 Tratamento com solvente

O tratamento com solvente foi realizado em extrator de Soxhlet (1000 mL), previamente tarado, contendo exatamente, 350 g do caroço de açaí seco e moído. Foram realizadas duas extrações: a primeira foi feita a remoção de lipídeos com n-hexano ($P_e = 68^\circ\text{C}$, P.A, CRQ, Brasil) e a segunda foi feita a remoção do pigmento com etanol ($P_e = 78,5^\circ\text{C}$, P.A, CRQ, Brasil), sendo o tempo de extração para cada solvente de 12 e 24 horas, respectivamente. Após o final de cada extração, o excesso de solvente contido no copo extrator, foi removido, sendo em seguida, submetido a secagem em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a $105 \pm 5^\circ\text{C}$, até peso constante. Para cada uma das extrações foram usados a relação soluto-solvente de 1:5 (m/m). Os ensaios foram realizados em duplicata.

O solvente de cada extração foi removido em evaporador rotativo (HEIDOLPH, Laborota 4000), a pressão reduzida na temperatura de 50°C até, aproximadamente, 1/5 do seu volume. Os extratos hexânico (CAH) e etanoico

(CAEtOH) foram transferidos para frascos de vidro âmbar e armazenado em freezer doméstico (Cooler H-300 Eletrolux) a -10 °C. Os rendimentos dos extratos foram calculados pela razão entre a massa de extrato seco em relação à massa da amostra seca.

3.2.2 Caracterização do CA

3.2.2.1 Umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a 105 ± 5 °C, até peso constante, de acordo com método 935.29 da AOAC (2002).

3.2.2.2 Voláteis

A determinação do teor de voláteis foi realizada de acordo com a norma ASTM D 3175-07 (2004), as quais foram adaptadas para análise em forno mufla (LINN ELEKTRO THERM, LM 312.6 SO 1729). As amostras foram submetidas a temperaturas de até 950 °C durante o período de 10 minutos.

3.2.2.3 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por incineração da amostra em forno mufla (LINN ELEKTRO THERM, LM 312.6 SO 1729) a 525 °C, de acordo com a norma ASTM D 3174-04 (2007).

3.2.2.4 Carbono fixo

A determinação de carbono fixo foi realizada de acordo com método ASTM D6316-09 (1993). O teor de carbono fixo é uma medida indireta, sendo calculado de acordo com a Equação 13.

$$\text{Carbono Fixo [\%]} = 100 - (\% \text{cinzas} + \% \text{materiais voláteis}) \quad (13)$$

3.2.2.5 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada por extração com solventes (n-hexano), em extrator Soxhlet, de acordo com método 963.15 da AOAC (2002).

3.2.2.6 Proteínas bruta (Método de Kjeldahl)

O teor de proteína foi determinado de acordo com o método 991.20 da AOAC (2000), as amostras foram submetidas a digestão com adição de H₂SO₄ concentrado até o ponto de ebulição em bloco digestor (TECNAL, Modelo, TE-1001, Brasil). Em uma segunda etapa, o material digerido foi destilado em destilador de nitrogênio (MARCONI, MA-036). O nitrogênio total (N_T) foi calculado de acordo com a Equação 14.

$$N_T = \frac{(V_a - V_b) \cdot F \cdot 0,01410}{M_1} \quad (14)$$

Onde, N_T é o teor de nitrogênio total na amostra (%); V_a e V_b são os volumes (mL) da solução de ácido clorídrico gastos na titulação da amostra e do branco, respectivamente; F é o fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol.L⁻¹ e M₁ é a massa da amostra (g). O cálculo da proteína bruta (P_B) foi realizado de acordo com a Equação 15.

$$P_B = N_T \cdot F_N \quad (15)$$

Onde, P_B é o teor de proteína bruta na amostra (%); N_T é o teor de nitrogênio total na amostra (%) e F_N = 6,25 (fator usado para converter o nitrogênio em proteína).

3.2.2.7 Fibras

A determinação de fibras foi realizada de acordo com a norma padrão “Dosage des fibres VAN SOEST, Weened”, desenvolvida pelo INRA, Narbonne (BUFFIERE & LOISEL, 2007).

3.2.2.8 Celulose e Hemicelulose

Para a determinação dos teores de celulose e hemiceluloses foi necessário extrair a holocelulose (celulose + polioses) da amostra. Para a extração da holocelulose, foram transferidos para um Becker (250 mL), 5,0 g do CA (seco e moído) livre de extrativos, contendo 60 mL de água destilada, 10 mL de hipoclorito de sódio (6%) e 7 mL de ácido acético glacial. O sistema foi aquecimento em banho-maria ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 60 minutos, com agitação constante.

A separação do resíduo foi realizada por filtração a vácuo em um funil de placa sinterizada n°4 (previamente tarado). Este procedimento foi repetido até o aparecimento de um resíduo branco. A lavagem do resíduo foi realizada com 300 mL de água ultrapura, posteriormente, foi seco em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a $105 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante. O teor de homo celulose foi calculado pela razão entre a massa de resíduo seco em relação à massa da amostra seca.

Para a determinação de celulose, o resíduo (holocelulose) foi transferido para um balão de destilação (500 mL), contendo, 200 mL de hidróxido de potássio a 15% (m/v). A mistura foi aquecida sob refluxo até a ebulição, durante 60 minutos. A separação do resíduo foi realizada por filtração a vácuo em um funil de placa sinterizada n°4 (previamente seco e tarado). A lavagem do resíduo foi realizada com água ultrapura (3 x 100 mL, $T \approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), posteriormente, foi seco em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a $80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante.

O teor de celulose foi calculado pela razão entre a massa de resíduo seco em relação à massa de homo celulose. A diferença entre o teor de holocelulose e o teor de celulose representa o teor de hemicelulose no CA.

3.2.2.9 Lignina Insolúvel (Klason - TAPPI, 1999)

Em um Erlenmeyer (250 mL) contendo 5,0 g do CA (seco e moído), foram transferidos 50 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m). A mistura foi submetida a agitação constante em um agitador magnético (FISATOM, Modelo 752A) durante 24 h em temperatura ambiente ($T \approx 28,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após esse período, a mistura foi transferida para um balão de destilação (1000 mL), contendo 500 mL de água destilada e aquecido sob refluxo ($T \approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 5 horas.

A lignina insolúvel foi separada por filtração a vácuo em cadinho de placa sinterizada (n° 4), previamente tarado. Depois de lavado com água destilada (5 x 100 mL, $T \approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), o resíduo foi seco em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a $105 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante. O teor de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a Equação 16.

$$Lignina [\%] = \left(\left(\frac{M_2}{M_1} \right) \cdot 100 \right) - cinzas \quad (16)$$

Onde, M_1 é a massa do CA utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade (g); M_2 é a massa de lignina insolúvel seca (g) e cinzas (%).

3.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

Com o objetivo de agregar valor a biomassa do caroço de açaí, foi realizada a dosagem da capacidade antioxidante do pigmento (CAEtOH), obtido no Item 3.2.7.1, pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A solução estoque de DPPH (60 mM) foi preparada a partir da dissolução de 2,4 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) em 100 mL de metanol (HPLC, Tedia, Brasil). A solução deve ser preparada no dia da análise e armazenada em frasco de vidro âmbar. As soluções do extrato CAEtOH foram preparadas em metanol nas seguintes concentrações: 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 e 3,91 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada, mediante a construção da curva padrão de DPPH nas concentrações de 5 a 30 μM . A leitura dos extratos/diluições foi realizada em um espectrofotômetro digital (THERMO SCIENTIFIC, Modelo Genesys 10S UV-Vis) a 517 nm. A prova em branco foi feita com 2,0 mL de metanol e 0,5 mL de DPPH. As análises foram realizadas em triplicatas.

A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a Equação 17.

$$AA [\%] = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}}{Abs_{DPPH}} \right) \cdot 100 \quad (17)$$

Onde, Abs_{DPPH} e $Abs_{Amostra}$, são as absovâncias [nm] do controle e da amostra, respectivamente.

3.2.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

A determinação do pH foi realizada em pH metro digital, de acordo com método potencio métrico 945.10 da AOAC (1997). O pH foi determinado por leitura direta em um titulador automático Titroline Plus (SCHOTT, D-85719, Germany), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0.

3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura//Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV/EDS)

A análise das amostras (caroço e fibras do caroço de açaí *in natura*) foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, em um Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada (HITACHI, TM 3000), operando a 15 kV com sistema acoplado para análise química semi-quantitativa por EDS, com software para análise *line scan* (análise química ao longo de uma linha dentro de uma região selecionada), operando sempre no modo elétrons retro espalhados (BSE – *backscattered secondary electrons*).

3.2.6 Hidrólise Enzimática

3.2.6.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática total foi determinada de acordo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (1996). Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por 1 mL de caldo por minuto ($\text{UI} = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), sendo expressa em unidades de papel filtro (FPU, *Filter Paper Unit*) ou atividade em papel filtro, por mililitro ($\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Em diferentes tubos de ensaio, contendo uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm), pesando aproximadamente 50 mg, foram transferidos 0,5 mL do complexo enzimático e 1 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8).

A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 3 mL

do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), posteriormente, os tubos foram colocados em banho maria até ebulição ($T \approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos, depois foram adicionados 20 mL de água destilada, em seguida, os tubos foram levemente agitados para a completa homogeneização da mistura.

Para a prova em branco o complexo enzimático foi substituído pela solução tampão acetato de sódio (5 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicata. Para o cálculo da atividade enzimática, foram considerados a quantidade absoluta de glicose de 2,0 mg (Equação 18).

$$2,0\text{ mg glicose} = \frac{2,0}{0,18016\mu\text{mol}} \quad (18)$$

Esta quantidade de glicose é produzida por 0,5 mL de enzima em 60 minutos, isto é, na reação de FPU:

$$2,0\text{ mg glicose} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})} \quad (19)$$

$$2,0\text{ mg glicose} = 0,37\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (20)$$

$$\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{0,37}{\text{Conc. de enzima referente a } 2,0\text{ mg glicose}} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (21)$$

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

1 UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de “glicose” (açúcar redutor como glicose) convertido

1 UI = 0,18016 mg $\cdot \text{min}^{-1}$ (quando o produto é glicose)

Para determinar a concentração de enzima necessária para produzir exatamente 2,0 mg de glicose, foram feitas três diluições (m/v), plotando-se a concentração de glicose liberada *versus* a concentração de enzima em um gráfico semi-logarítmico.

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} = \left(\frac{\text{Volume da enzima na diluição}}{\text{Volume total de diluição}} \right) \quad (22)$$

Com o valor da concentração de enzima conhecida, foram calculadas as unidades de acordo com a Equação 23.

$$FPU.mL^{-1} = \frac{2,0}{0,18016 . V_C . t . [Enzima\ diluída]} \quad (23)$$

Onde, V_C é o volume do caldo enzimático utilizado na hidrólise (mL), t é o tempo de hidrólise (min) e 0,18016 é igual a 1 μ mol de glicose (mg).

3.2.6.2 Açúcares redutores totais (ART)

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose nas concentrações de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹. A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (THERMO SCIENTIFIC, Modelo Genesys 10S UV-Vis) a 540 nm.

3.2.6.3 Hidrólise enzimática do caroço do açaí

Nas reações de hidrólise enzimáticas, foram utilizados caroços de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT).

3.2.6.4 Ensaios preliminares de hidrólise

Estes ensaios, objetivaram, avaliar a melhor condição de pré-tratamento do CA (Item 3.2.1.3), usado no processo de hidrólise enzimática com massa reduzida. Foram realizados doze ensaios, divididos em quatro condições experimentais: CANT60 e CAT60 (T = 60 °C); CANT70 e CAT70 (T = 70 °C). A concentração inicial da polpa do CA correspondeu a 40 g.L⁻¹. A carga enzimática (total) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato (m/m).

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 100 mL, contendo 1,0 g do CA pré-tratado, 20 mL de água destilada e 5 mL de solução tampão de citrato (pH = 4,8). A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) nas temperaturas de 60 e 70 °C.

Foram realizadas coletas para os tempos de 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas. A inativação enzimática foi realizada em água fervente ($T \approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos. A separação do hidrolisado da polpa foi realizada por filtração à vácuo em cadinho de placa sinterizada (n° 1).

As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no Item 3.2.6.2. Em paralelo, foi realizada a prova em branco para cada ensaio, substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (25 mL, pH = 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.2.6.5 Ensaio de hidrólise enzimática

Mediante a análise preliminar dos resultados de hidrólise do CA com massa reduzida (Item 3.2.8.1, novos ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL, contendo, cerca 10 g CA, 250 mL de água, o pH foi ajustado com solução tampão de citrato para 4,8. A concentração inicial da polpa do CA foi de $40,14\text{ g.L}^{-1}$ (CANT60), $40,100\text{ g.L}^{-1}$ (CAT60), $40,08\text{ g.L}^{-1}$ (CANT70), e de $40,08\text{ g.L}^{-1}$ (CAT60).

A carga enzimática (total) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato. Em paralelo, para cada ensaio, foi realizada a prova em branco substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (250 mL, pH = 4,8). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Os frascos foram submetidos a incubação em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) nas temperaturas de $60 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e de $70 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação periódica, foram realizadas coletas de nos tempos de 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas. Os hidrolisados foram submetidos a inativação enzimática em banho maria ($T \approx 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 1 hora, após este período, a mistura foi filtrada em cadinho de placa sinterizada (n° 1). As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no item 3.2.6.5.

Os rendimentos da hidrólise foram expressos como: (R1) relação entre a concentração final de glicose (g.L^{-1}) em relação a concentração de inicial da polpa do caroço de açaí (g.L^{-1}), (R2) relação entre a concentração final de glicose (g.L^{-1}) em relação a concentração inicial de celulose (g.L^{-1}) e (R3) relação da concentração final de glicose (g.L^{-1}) em relação inicial de glicose (g.L^{-1}).

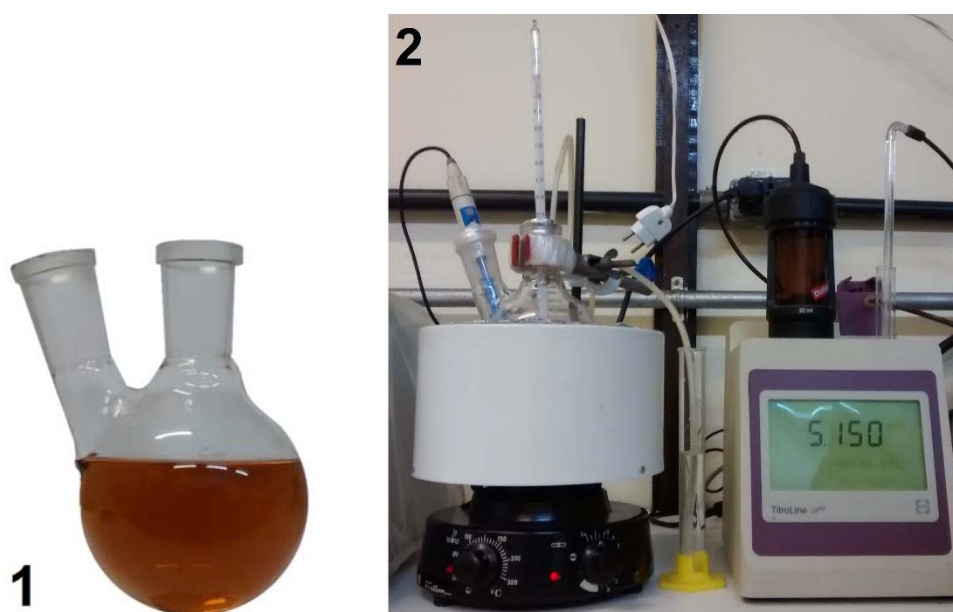
A concentração de celulose foi calculada pela seguinte relação: *massa do caroço de açaí* (g), multiplicado pelo *teor de celulose contido na amostra* (40,25%), divididos pelo *volume total do hidrolisado* (L). Conhecido a quantidade de celulose contida na amostra, se efetuou o cálculo da quantidade teórica de glicose (g).

3.2.7 Fermentação Alcóolica

A fermentação alcoólica foi realizada em balão de vidro (fundo redondo) de 250 mL, contendo, 200 mL do hidrolisado com o pH ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico 1:1 (v/v), a inoculação do mosto foi feita com a adição de 2 g de fermento comercial seco instantâneo (*Saccharomyces cerevisiae*, FLEISCHMANN), correspondendo a uma concentração inicial da levedura de 1% (m/v).

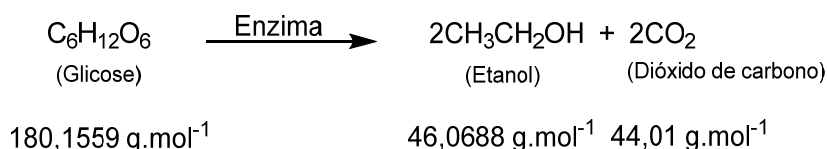
A mistura foi submetida à incubação em agitador magnético (FISATOM, modelo 52M) a 33 ± 1 °C, com agitação constante de 120 rpm, durante 24 horas. As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no item 3.2.6.5. O etanol produzido foi obtido por destilação simples. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Figura 15. (1) Hidrolisado do caroço de açaí ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$) e (2) reator batelada



Fonte. Autor, 2016.

Na fermentação alcoólica de açúcares, por ação de leveduras, os principais produtos obtidos em proporções equimolares são: o etanol e o dióxido de carbono, conforme a equação estequiométrica:



Para cada 180,1559 kg de glicose, são produzidos 92,1376 kg de etanol, ou seja, cada quilograma de glicose corresponde a 511,4326 kg de etanol. A massa de etanol dividido pela massa específica do etanol ($789,23 \text{ kg.m}^{-3}$) resulta em 0,648014 L de etanol por kg de glicose. Esse resultado é denominado "rendimento estequiométrico da fermentação", ou seja, o volume em litros de etanol que pode ser produzido por quilograma de glicose.

O coeficiente de Gay-Lussac (rendimento teórico) é de 51,1% em massa, sendo este, usado para o cálculo da taxa de conversão de glicose em etanol (JACKMAN, 1991).

O rendimento da fermentação (Rf), a produtividade (Qp) e quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido ($Y_{P/S}$), foram calculados pelas Equações 24, 25 e 26.

$$Rf[\%] = \frac{C_{(EtOH)Exp}}{C_{(EtOH)Teo}} \cdot 100 \quad (24)$$

Onde, $C_{(EtOH)Exp}$, é a concentração de etanol experimental (g.L^{-1}) e $C_{(EtOH)Teo}$ concentração de etanol teórico ($\Delta C_{\text{Glicose}} (\text{g.L}^{-1}) \times 0,5114326$).

$$Qp [\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}] = \frac{C_{(EtOH)Exp}}{t} \quad (25)$$

Onde, $C_{(EtOH)Exp}$, é a concentração de etanol experimental (g.L^{-1}) e t , é o tempo de fermentação (h).

$$Y_{P/S} [g \cdot L^{-1}] = \frac{C_{(EtOH)Final} - C_{(EtOH)Inicial}}{C_{(Glicose)Inicial} - C_{(Glicose)Final}} \quad (26)$$

Onde, $C_{(EtOH)Final}$ e $C_{(EtOH)Inicial}$, são as concentrações inicial e final de etanol ($g \cdot L^{-1}$) e $C_{(Glicose)Inicial}$ e $C_{(Glicose)Final}$, são as concentrações inicial e final de glicose ($g \cdot L^{-1}$).

3.3 AJUSTES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DO CA

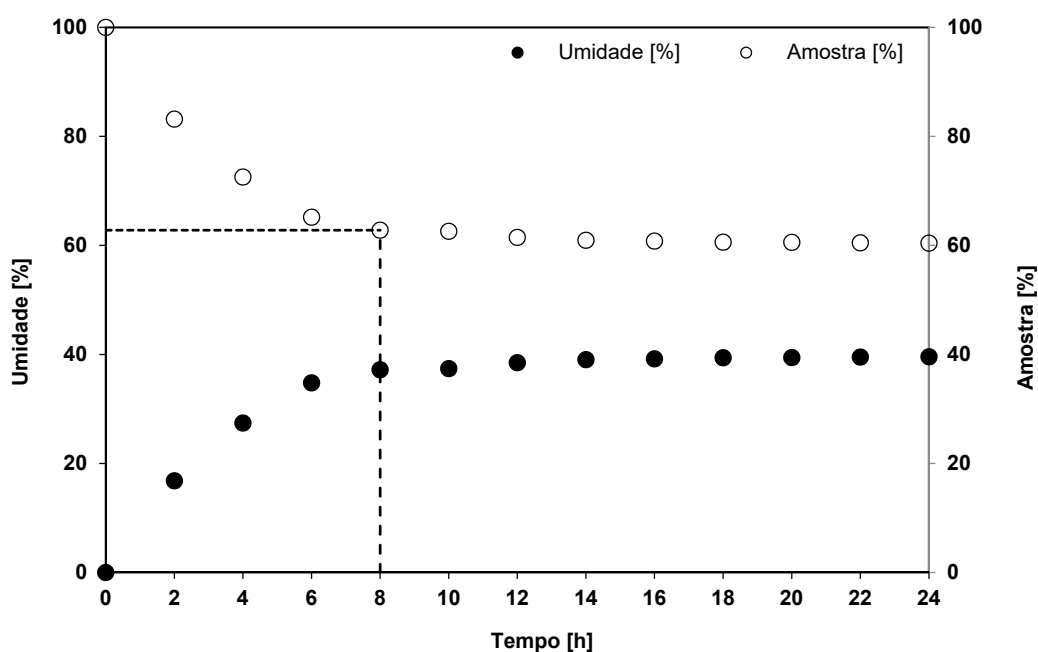
Este estudo foi baseado na modelagem cinética a partir dos dados experimentais da hidrólise enzimática do CA, obtidos por diferentes tratamentos (CANT e CAT), foram ajustados aos modelos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk. Os parâmetros cinéticos das reações enzimáticas foram ajustados pelo aplicativo SOLVER na planilha eletrônica EXCEL 2016 (16.0.4366.1000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

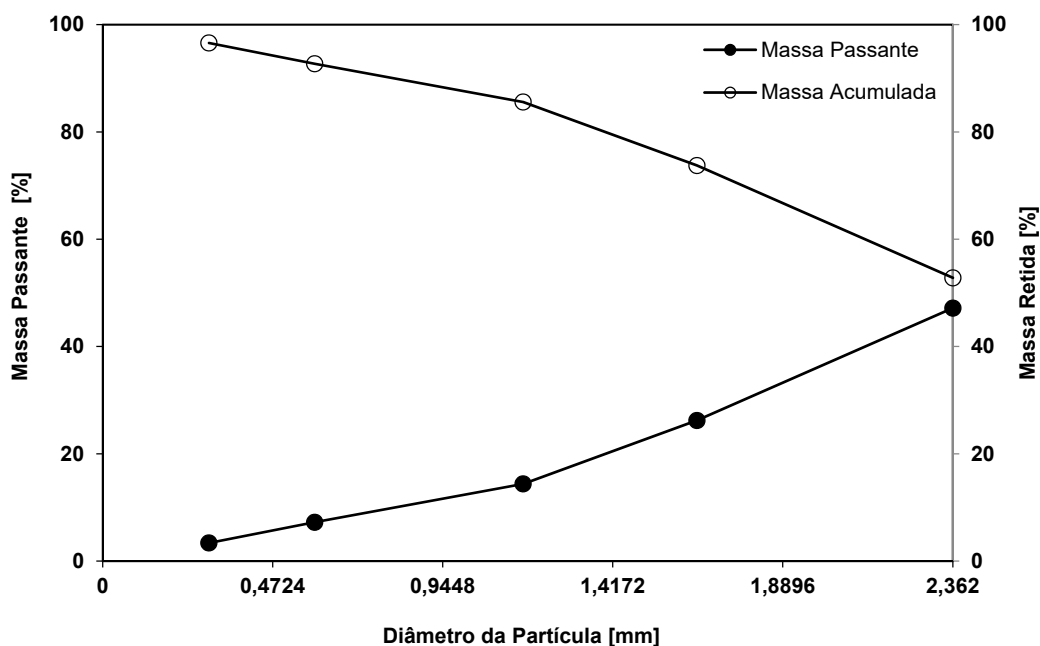
4.1 TRATAMENTO DO CAROÇO DE AÇAÍ

O teor de umidade e o rendimento em base úmida do caroço de açaí “*in natura*” foi de 39,59 e 60,41%, respectivamente. De acordo com o perfil da curva de secagem do caroço de açaí (Figura 16), indica que a secagem ocorreu nas primeiras 8 horas, correspondendo ao primeiro período da taxa decrescente. Isto sugere que o caroço de açaí apresenta em sua estrutura externa uma maior concentração de água.

Figura 16. Curva de secagem do caroço de açaí ($T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{ar} = 0,5\text{ m.s}^{-1}$)



Na Figura 17, é apresentada a curva granulométrica do caroço de açaí, a fração média do caroço de açaí não peneirado foi de 52,82%, correspondente a um diâmetro de 2,362 mm. Neste estudo, foram utilizadas partículas de diâmetro 48 mesh (0,295 mm), o rendimento médio foi de 3,40%. O processo de moagem foi repetido até que fosse obtida uma quantidade de substrato suficiente para a realização dos experimentos.

Figura 17. Curva granulométrica do caroço de açaí

Na literatura são encontrados estudos sobre a influência do tamanho de partícula na conversão de biomassa. Entretanto, há muita divergência nos resultados obtidos, alguns autores defendem a ideia de que partículas pequenas, contribuem para uma melhor eficiência na conversão de biomassa, enquanto outros, sugerem que há pouca ou nenhuma diferença quando são utilizadas partículas de diâmetro reduzido (ZHENG et al. 2007; LIU et al. 2013; VIDAL Jr. et al., 2011).

Por outro lado, a redução do tamanho de partícula da biomassa é um processo bastante oneroso (LIU et al., 2013). A redução do tamanho da partícula tem como principal objetivo, aumentar sua superfície de contato, melhorar a transferência de calor e massa no processo, bem como, reduzir a cristalinidade das fibras de celulose, de modo a alcançar melhores conversões (ZENG et al., 2007; LIU et al., 2013).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CAROÇO DE AÇAÍ

Na Tabela 6, são apresentados os resultados da caracterização do caroço de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT). Os teores de umidade, lipídeos, proteínas, fibra bruta hemicelulose, celulose, lignina, voláteis, carbono fixo e cinzas, apresentam variações na composição quando comparados com outros resultados da

literatura Altman (1956) e Kabacznik & Rogez (1998). Estas diferenças podem estar relacionadas às características morfológicas e químicas ou pode ser atribuído a diferentes fatores, como solo, clima, período de colheita e sazonalidade etc.

Tabela 6. Composição média do caroço de açaí (g/100 g em base seca)

Composição [%]	Amostra		ALTMAN (1956)	KABACZNIK & ROGEZ (1998)
	CANT	CAT		
Umidade	10,15	9,85	13,6	58,3
Lipídeos	0,61	---	3,48	1,65
Proteínas	6,25	4,86	5,02	5,56
Fibra Bruta	29,79	28,64	62,95	81,29
Hemicelulose	5,5	3,82	14,19	---
Celulose	40,29	39,55	39,83	---
Lignina	4	1,07	8,93	---
Voláteis	0,5	---	---	---
Carbono Fixo	0,83	0,76	---	---
Cinzas	0,15	0,13	1,55	5,97
Total [%]	98,07	88,68	86,6	152,77

Para o CANT e CAT, os balanços de massas não totalizaram 100%, dados citados na literatura também mostram fato semelhante para o bagaço de cana-de-açúcar (91%), palha de trigo (95%), sabugo de milho (95%) e grama (88,4%) (PANDEY et al., 2000; SUN & CHENG, 2002).

De acordo com Marabezi (2009), valores entre 98 a 102% para o balanço de massa são considerados aceitáveis, uma vez que esta margem de erro leva em consideração o número de etapas de análises, ou mesmo o número de análises, que, combinados com o erro individual, acarretam lapsos ou sobreposições de resultados.

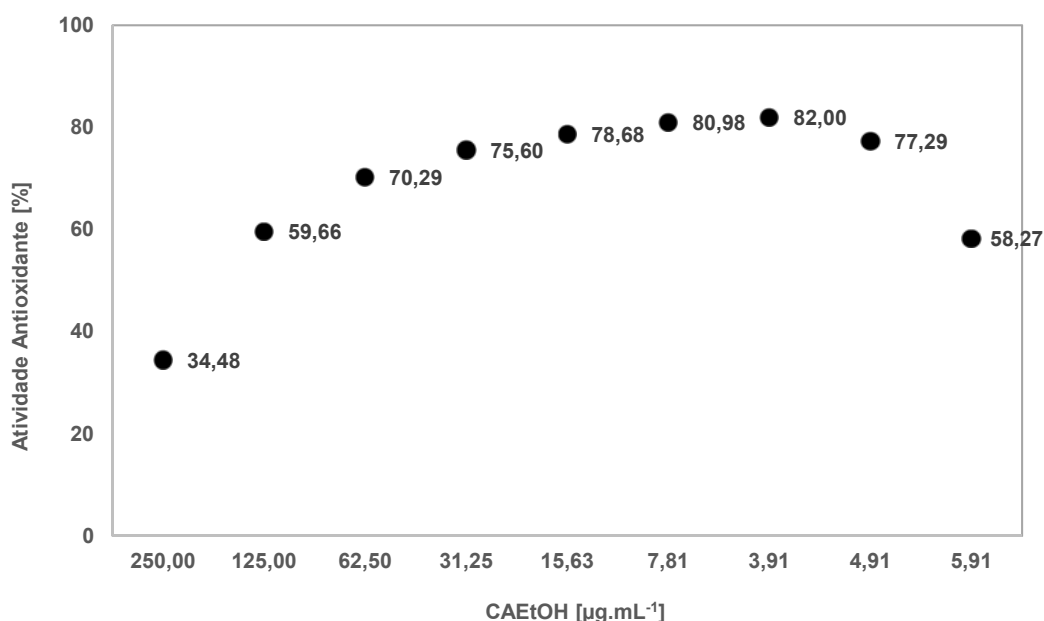
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) é um radical livre, utilizado para avaliação da capacidade antioxidante. Este ensaio se baseia no princípio de que o radical DPPH recebe um hidrogênio da molécula antioxidante resultando em redução do DPPH

(Radical livre) para DPPH (Reduzido). Na reação ocorre a mudança da cor violeta para o amarelo, a qual é monitorada por espectrofotometria (MISHRA et al., 2012).

Na Figura 18, são apresentados os resultados da capacidade antioxidante do extrato etanólico do caroço de açaí *in natura* (CAEtOH) frente ao radical DPPH 0,3 mM. A maior atividade antioxidante (82%) correspondeu a menor concentração do CAEtOH ($3,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a menor atividade antioxidante (34,48%) correspondeu a maior concentração do CAEtOH ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A fração do CAEtOH para reduzir em 50% ($\text{EC}_{50} = 172,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a concentração inicial do radical DPPH não foi o mais ativo.

Figura 18. Avaliação do potencial antioxidante do CAEtOH pelo método DPPH (0,3 mM, t = 30 min)

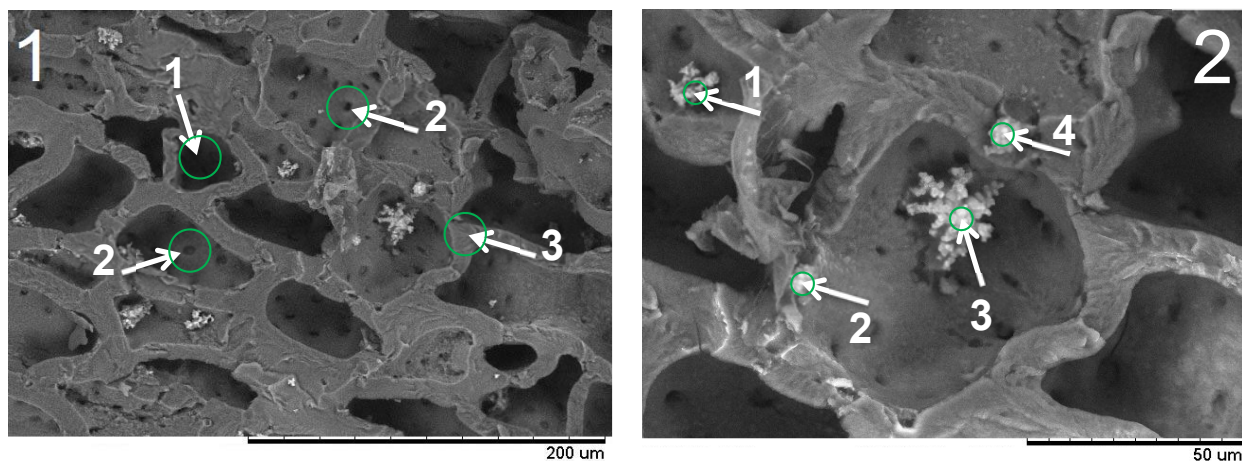


Em geral, a atividade antioxidante do açaí, é atribuída aos flavonoides, substâncias naturalmente presentes nas plantas e exibem importantes efeitos benéficos sobre a saúde humana como os efeitos anti-isquêmico, antiagregantes plaquetários, anti-inflamatórios, o que torna esses polifenóis particularmente úteis na prevenção de patologias humanas em que produção de radicais livres desempenha um papel fundamental, como aterosclerose, lesão isquêmica, envelhecimento, doenças neurológicas degenerativas (Parkinson e Alzheimer), inflamação e câncer (SAKANO et al., 2005).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA/ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (MEV/EDS)

Na Figura 19, é apresentada a micrografia do caroço do açaí *in natura* (corte transversal). A micrografia 1, apresenta uma estrutura aberta com espaços vazios (1), pontuações (2) e fibras (3) unidas pela presença de hemicelulose e lignina. Na micrografia 2 (ampliação), é possível observar a presença de cristais sílica na forma de roseta (Pontos 1, 2, 3 e 4).

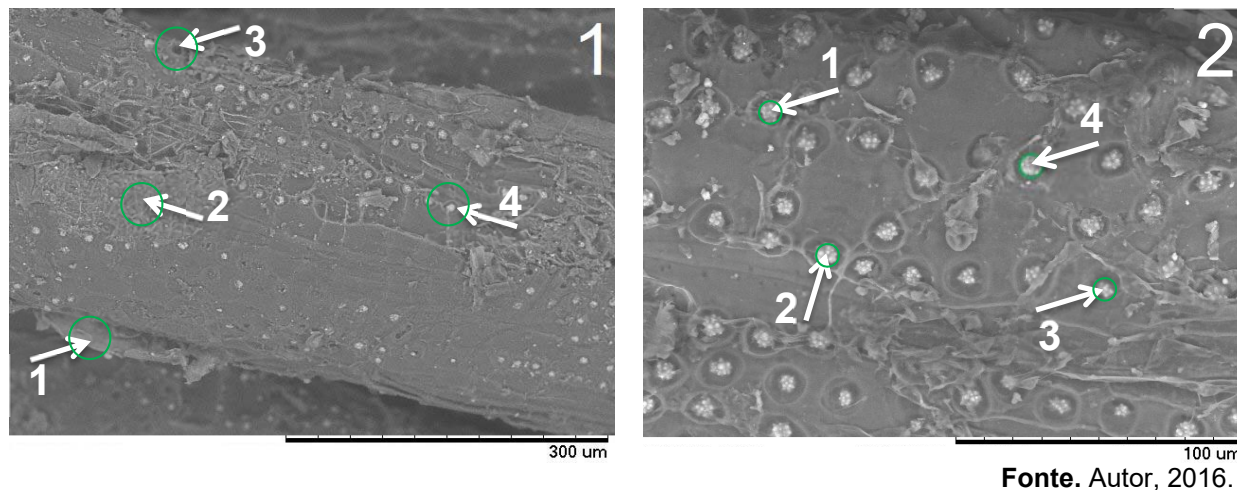
Figura 19. Micrografias do corte transversal caroço de açaí (mesocarpo). Ampliação de 500x (1) e ampliação de 1,2k (2)



Fonte. Autor, 2016.

Na Figura 20, é apresentada a micrografia das fibras caroço do açaí *in natura*. A micrografia 1, apresenta uma estrutura cilíndrica compacta, flocos de medula (1), cutícula (2), pontuações (3) e cristais de sílica (4) dispostos aleatoriamente. Na micrografia 2 (ampliação), é possível observar a presença de cristais sílica dentro das cavidades globulares (Pontos 1, 2, 3 e 4).

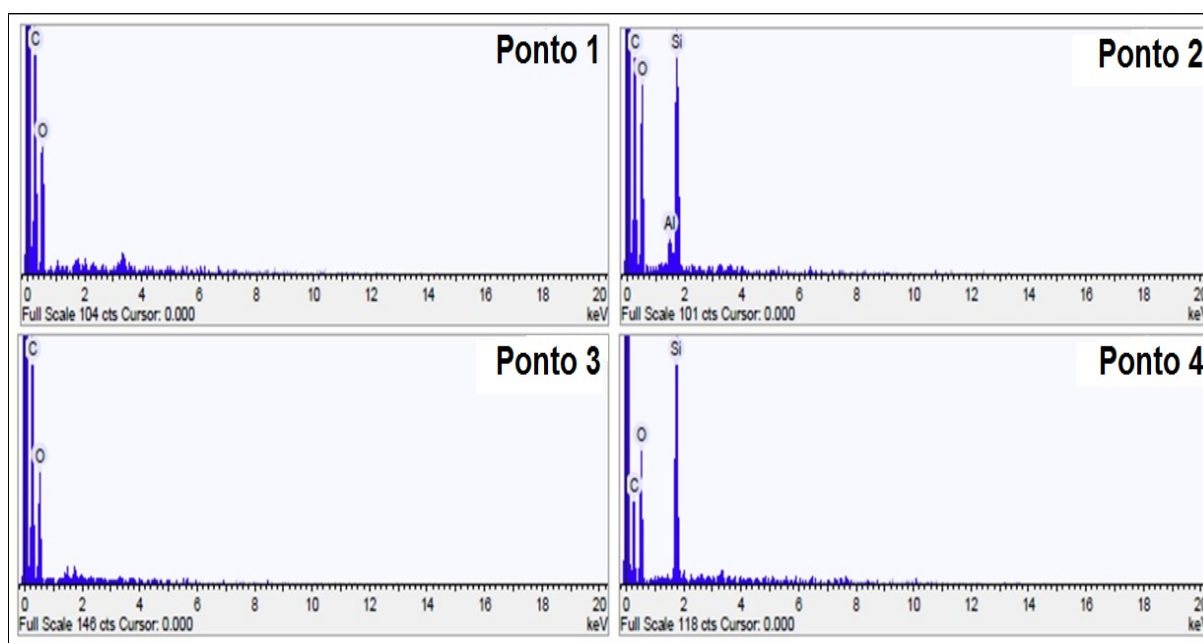
Figura 20. Micrografias do perfil longitudinal fibra do caroço de açaí. Ampliação de 300x (1) e ampliação de 1,2k (2)



Fonte. Autor, 2016.

A análise química semi-quantitativa por EDS do corte transversal do mesocarpo do caroço de açaí (Figura 19.2), registrou os seguintes elementos, C, O, Si e Al (Figura 21). Os teores de C variaram entre 43,251 a 56,019%, os teores de O variaram entre 40,165 a 48,509%. Nos pontos 3 e 4 os teores de Si foram de 7,821 e 14,097%, respectivamente. No ponto 2, o teor de Al foi de 0,982% (Tabela 7).

Figura 21. Espectros de EDS do corte transversal do mesocarpo do caroço de açaí *in natura*



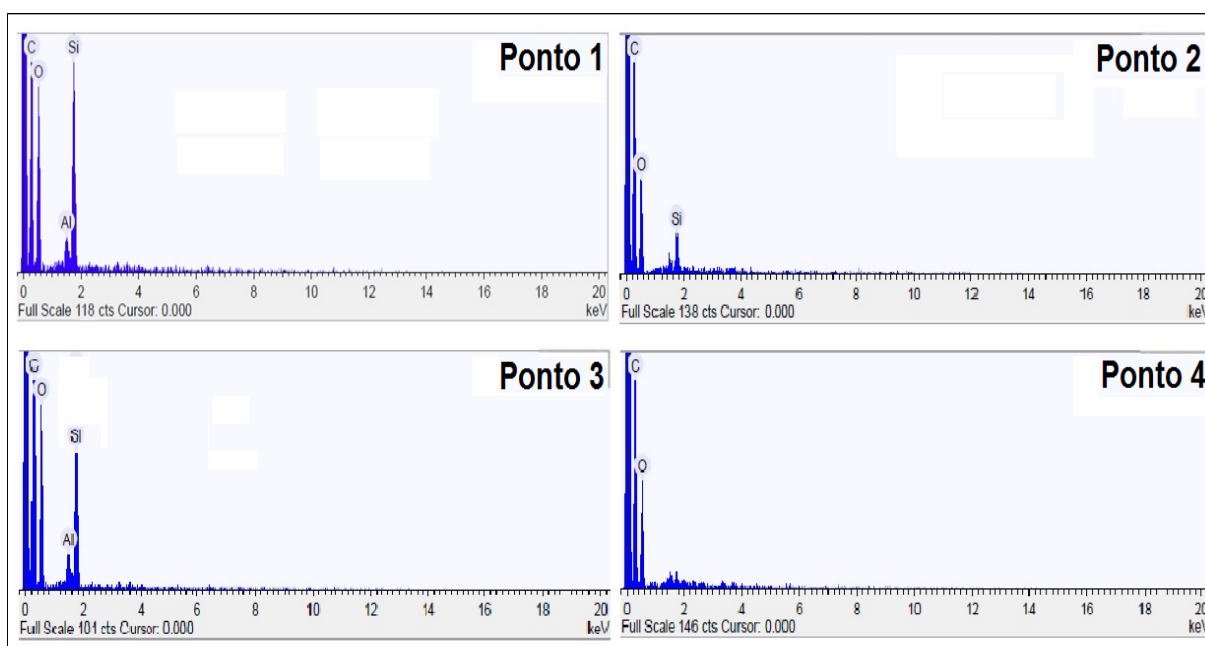
Fonte. Autor, 2016.

Tabela 7. Análise química semi-quantitativa do mesocarpo do caroço de açaí *in natura* (corte transversal)

Ponto	C [%]	O [%]	Si [%]	Al [%]	Total
1	51,491	48,509	---	---	100
2	51,032	40,165	7,821	0,982	100
3	56,019	43,981	---	---	100
4	43,251	42,652	14,097	---	100

A análise química semi-quantitativa por EDS da fibra do caroço de açaí (Figura 20.2), registrou os seguintes elementos, C, O, Si e Al (Figura 22). Os teores de C variaram entre 52,025 a 60,486%, os teores de O variaram entre 36,964 a 43,446%. Nos pontos 1, 2 e 3 os teores de Si variaram entre 0,854 a 1,955%. Nos pontos 1 e 3, o teor de Al foram de 7,67 e 6,415% (Tabela 8).

Figura 22. Espectros de EDS da fibra (perfil longitudinal) do caroço de açaí *in natura*



Fonte. Autor, 2016.

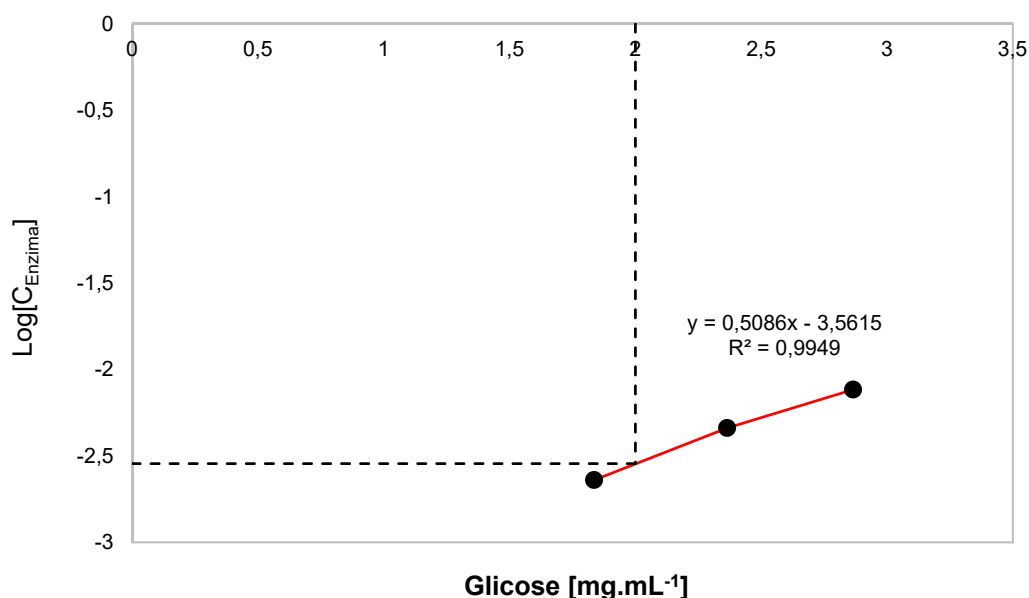
Tabela 8. Análise química semi-quantitativa da fibra do caroço de açaí *in natura* (perfil longitudinal)

Ponto	C [%]	O [%]	Si [%]	Al [%]	Total
1	52,025	39,451	0,854	7,67	100
2	60,486	36,964	2,55	---	100
3	54,113	37,517	1,955	6,415	100
4	56,554	43,446	---	---	100

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA TOTAL

Para determinar a atividade do complexo enzimático, foram realizadas três diluições em solução de citrato de sódio 50 mM (pH = 4,8): 1:500, 1:250 e 1:100, correspondendo as concentrações iniciais de enzimas de 0,0023, 0,0046 e 0,0077 (v/v). Com os dados obtidos, construiu-se um gráfico (Figura 23) onde se relaciona a concentração de enzima em função da massa de glicose liberada.

Figura 23. Atividade enzimática (método das diluições)



A partir da equação da curva, foi determinada a concentração de enzima.

$$y = 0,5086.x - 3,5615$$

$$y = \text{Log}[C_{\text{Enz}}] = 0,5086 \cdot (2 \text{ mg glicose}) - 3,5615$$

$$\text{Log}[C_{\text{Enz}}] = -2,5443$$

$$10^{\text{Log}[C_{\text{Enz}}]} = 10^{-2,5443}$$

$$[C_{\text{Enz}}] = 0,002856$$

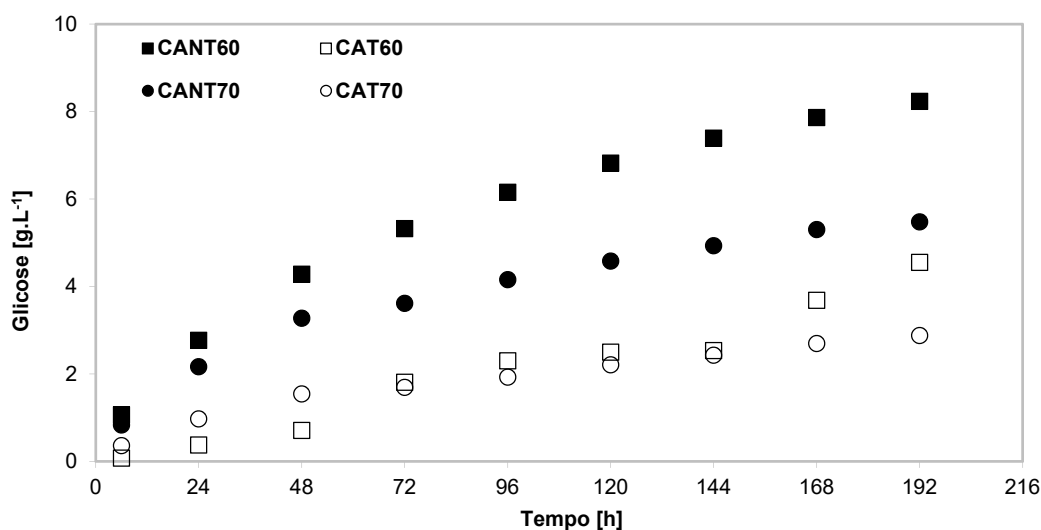
A atividade enzimática total do complexo enzimático foi realizada de acordo com a Equação 23. O valor da atividade do complexo enzimático obtido ($129,57 \text{ FPU.mL}^{-1}$) foi utilizado para os cálculos de volume de enzima necessário para os ensaios de hidrólise.

4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

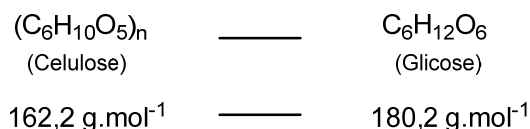
Os ensaios preliminares de hidrólise do caroço de açaí foram importantes para definir as melhores condições experimentais adotadas neste estudo. Nestes ensaios, foram considerados apenas o açúcar fermentescível glicose como produto da hidrólise para avaliar a eficiência do tratamento por meio do cálculo de seu rendimento, desconsiderando-se assim, os demais açúcares produzidos.

Os resultados obtidos no processo de hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT) em 192 horas (Figura 24), apresentaram taxas de conversão na temperatura de 60°C de 8,24 e 4,55% (CANT60 e CAT60) e na temperatura de 70°C de 5,48% e 2,89% (CANT70 e CAT70).

Figura 24. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (Tubo de ensaio, $C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$)



Os resultados experimentais ficaram abaixo dos rendimentos teórico 44,47% e 24,59% (CANT e CAT60) e de 29,95% e 15,58% (CANT70 e CAT70). O rendimento experimental foi calculado pela razão entre a massa de resíduo seco em relação à massa de amostra. Para o cálculo do rendimento teórico foi considerado a porcentagem de celulose determinada experimentalmente do caroço de açaí *in natura* (40,29%), sendo calculado de acordo com a equação estequiométrica:



Os resultados sugerem que o tratamento do caroço de açaí com solvente (CAT) influenciou na taxa de glicose liberada, ficando abaixo do não tratado (CANT), nas duas temperaturas. Outros fatores podem ter influenciado nas baixas taxas de conversão da biomassa caroço de açaí, como por exemplo, agitação e pH.

4.6.1 Estudo Comparativo da Hidrólise Enzimática do Caroço de Açaí

Nesta etapa, objetivou-se realizar um estudo sobre a hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT), bem como comparar seu potencial como fonte de glicose. Nas Tabelas 9 e 10, são apresentados os resultados (médios) da hidrólise do caroço de açaí.

De acordo com os resultados apresentados (Tabelas 9 e 10), as maiores concentrações de glicose foram obtidas para as polpas CANT60 (13,68 g.L⁻¹) e CANT70 (11,59 g.L⁻¹). As menores concentrações foram obtidas para as polpas CAT60 (9,22 g.L⁻¹) e CAT70 (4,93 g.L⁻¹)

As maiores taxas de conversão de celulose em glicose obtidas em 192 h de reação foram de 84,58% (CANT60) e 71,80% (CANT70), as menores de 57,06% (CANT60) e 30,38% (CAT70). Pelo cálculo estequiométrico de celulose convertidos em glicose é de 90,03%, ou seja, o CANT60 foi o que apresentou o melhor resultado (84,58%). O aumento da concentração de glicose com o decorrer do tempo, não foi constante a partir de um determinado tempo, o que era de ser esperado, devido a

diminuição da concentração de substrato para a enzima, ocasionando a diminuição da taxa de formação do produto

Tabela 9. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 60 °C, V_T = 250 mL, pH = 4,8)

t [h]	CANT60 (CA = 10,035 g)				CAT60 (CA = 10,025 g)			
	Glicose [g.L ⁻¹]	¹ Rend [%]	² Rend [%]	³ Rend [%]	Glicose [g.L ⁻¹]	¹ Rend [%]	² Rend [%]	³ Rend [%]
6	1,12	2,78	6,90	6,21	0,34	0,86	2,13	1,92
24	2,14	5,34	13,25	11,93	0,97	2,43	6,03	5,43
48	3,45	8,58	21,30	19,18	1,85	4,61	11,44	10,30
72	6,18	15,40	38,23	34,42	3,99	9,95	24,70	22,24
96	7,45	18,56	46,07	41,48	4,83	12,05	29,90	26,92
120	8,23	20,50	50,88	45,80	5,24	13,06	32,42	29,19
144	8,74	21,77	54,03	48,65	5,41	13,49	33,48	30,14
168	11,50	28,64	71,09	64,00	7,57	18,88	46,85	42,18
192	13,68	34,08	84,58	76,15	9,22	22,99	57,06	51,37

Tabela 10. Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 70 °C, V_T = 250 mL, pH = 4,8)

t [h]	CANT70 (CA = 10,020 g)				CAT70 (CA = 10,070 g)			
	Glicose [g.L ⁻¹]	¹ Rend [%]	² Rend [%]	³ Rend [%]	Glicose [g.L ⁻¹]	¹ Rend [%]	² Rend [%]	³ Rend [%]
6	1,70	4,23	10,51	9,46	0,47	1,16	2,87	2,58
24	4,14	10,32	25,65	23,09	1,06	2,64	6,55	5,89
48	5,93	14,77	36,72	33,06	1,76	4,36	10,82	9,74
72	6,21	15,47	38,46	34,63	2,07	5,13	12,72	11,46
96	6,83	17,01	42,29	38,07	2,41	5,99	14,87	13,38
120	9,03	22,49	55,90	50,33	2,97	7,37	18,30	16,48
144	9,79	24,38	60,60	54,56	3,75	9,31	23,10	20,80
168	10,61	26,44	65,72	59,17	4,46	11,07	27,47	24,73
192	11,59	28,89	71,80	64,64	4,93	12,24	30,38	27,35

A eficiência das hidrólises enzimáticas para as polpas CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70 foi de 40,29%. O cálculo da eficiência no processo de hidrólise do caroço de açaí foi realizado pela razão entre o rendimento experimental em relação ao rendimento teórico. Os perfis cinéticos para as diferentes condições do processo de hidrólise do caroço de açaí, são apresentados na Figura 25, 26, 27 e 28.

Figura 25. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CANT60 ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$)

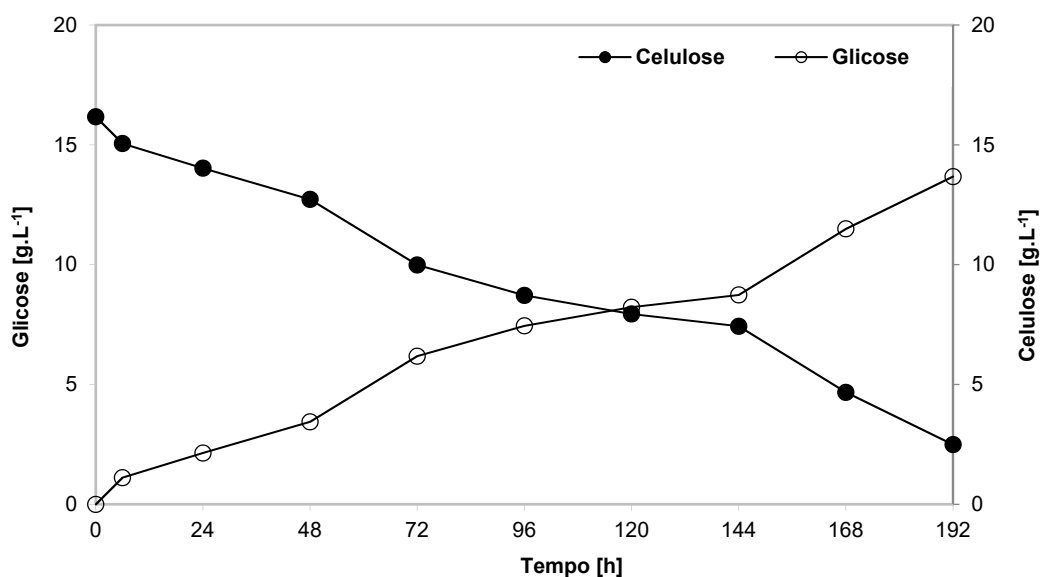


Figura 26. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CAT60 ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$)

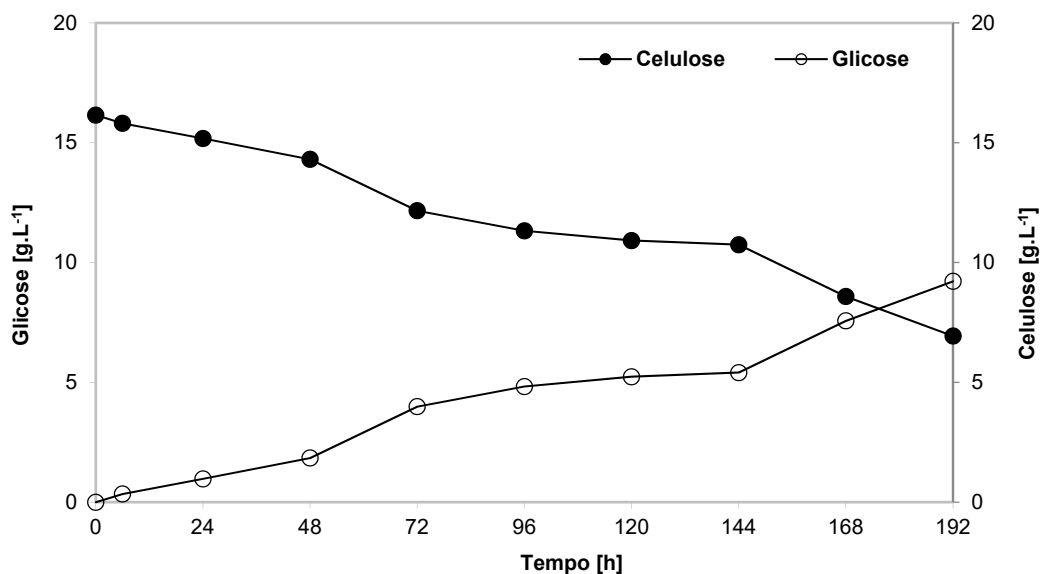
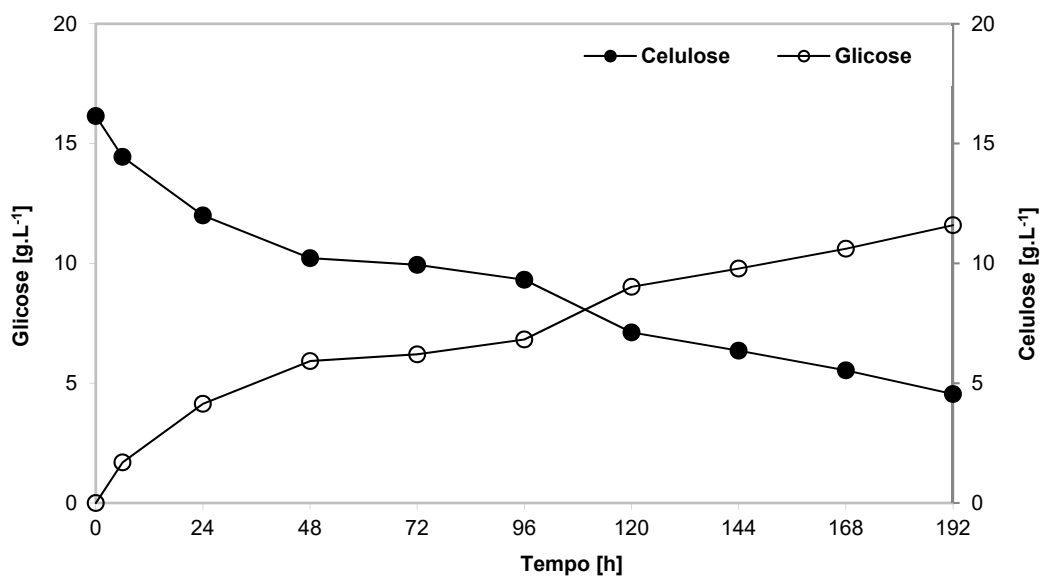
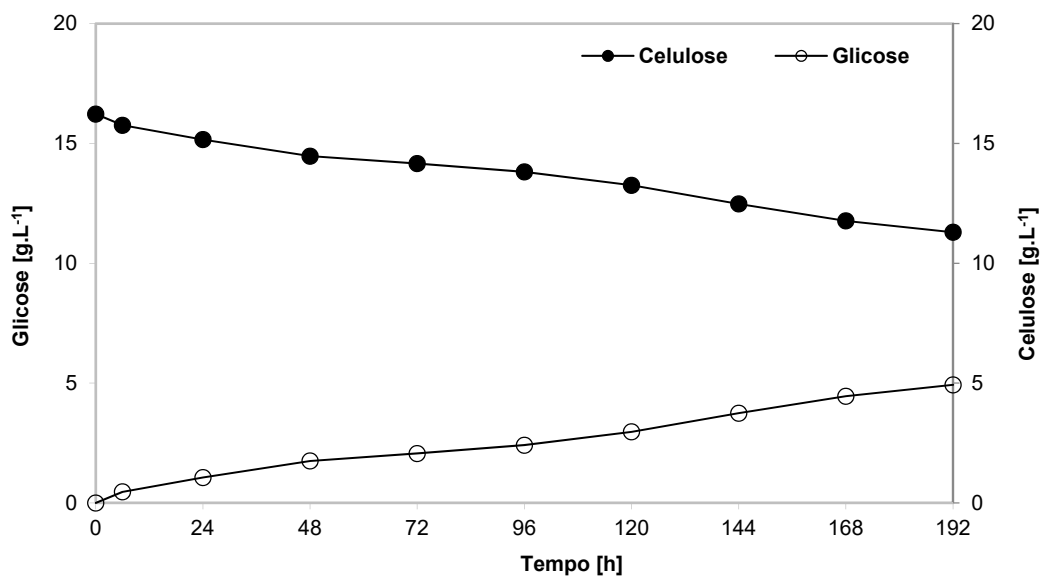


Figura 27. Perfil cinético da hidrólise enzimática do CANT70 ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$)**Figura 28.** Perfil cinético da hidrólise enzimática do CAT70 ($C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$)

4.7 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

O hidrolisado do caroço de açaí (CANT60) obtido no Item 4.6.1 (melhor condição) foi submetido à fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*,

durante 24 horas, com as seguintes características: concentração inicial média de glicose de $13,68 \text{ g.L}^{-1}$ e pH de 4,5. Na Tabela 11, são apresentados os resultados da fermentação alcoólica do CANT60.

Tabela 11. Fermentação alcoólica do hidrolisado do CANT60 ($T = 33 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h)

$C_{(\text{EtOH})\text{Teo}} [\text{g.L}^{-1}]$	$C_{(\text{EtOH})\text{Exp}} [\text{g.L}^{-1}]$	pH_{Final}	$\text{Rend} [\%]$	$Q_p [\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}]$	$Y_{P/S}$
5,8218	4,4360	5,15	87,08	0,1056	0,5869

De acordo com os dados da Tabela 11, podemos observar, que no final do processo fermentativo, a concentração de glicose residual foi de $0,049 \text{ g.L}^{-1}$, a taxa de conversão de glicose em relação a concentração inicial do hidrolisado foi de 99,64%.

Durante a fermentação, houve variação do pH, quando o pH não está tão favorável ao desenvolvimento dos microrganismos, a afinidade com o meio se torna mais lenta, o que dificulta o consumo do substrato, podendo levar as leveduras a flocularem, quando floculadas e ao fundo, os microrganismos perdem atividade (CALEJJA, 1974 e LIMA, 1999). Nas condições experimentais avaliadas, não foi possível identificar a existência de inibição do processo fermentativo. Em todos os ensaios, o valor do pH permaneceu dentro da faixa de pH indicada como a ideal para esse tipo de fermentação ($4 > \text{pH} < 6$).

O rendimento de etanol ($0,4451 \text{ g.g}^{-1}$) foi inferior ao valor máximo teórico de conversão ($0,511 \text{ g.g}^{-1}$), correspondendo a 87,08% e o rendimento em produto ($Y_{P/S} = 0,5869 \text{ g.g}^{-1}$), foi superior quando comparado com valores citados na literatura ($0,46 \text{ g.g}^{-1}$) para fermentações industriais (DAUGULIS & SWAINE, 1987; LIMA, BASSO & AMORIM, 2001 e LIMA & MARCONDES, 2002). A produtividade de etanol ($Q_p = 0,1056 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em 24 horas de reação, está abaixo dos valores encontrados na literatura para reações de fermentação em batelada, $6,85\text{-}9,88 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (TOSETTO, 2002) e de $5,97\text{-}9,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (FERREIRA, 2005).

Variações nos parâmetros cinéticos podem ser atribuídos a vários fatores como: agitação, pH, cepa de levedura, temperatura e concentração de substrato. A concentração inicial de glicose no meio de fermentativo ($13,68 \text{ g.L}^{-1}$) para a produção de etanol é muito baixa. Há a necessidade de aumentar essa concentração, visando o aumento da produção sem impactar no custo operacional.

4.8 CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ

A partir dos resultados experimentais da hidrólise enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70), Item 3.2.6.5, foram determinadas as constantes de Michaelis-Menten (K_m), de cinética da reação (k_{cat}) e da velocidade máxima de reação (V_{max}), baseado na equação de cinética enzimática proposta por Michaelis-Menten e na sua linearização (duplo recíproco), de acordo com a metodologia aplicada por Lineweaver-Burk. Os valores dos parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática do caroço de açaí

Parâmetros		CANT60	CAT60	CANT70	CAT70
V_{max} [g.L ⁻¹ .h ⁻¹]	Exp	2,4944	6,9376	4,5536	11,2985
	Cal	2,4902	6,9486	4,5746	11,3217
K_m [g.L ⁻¹]	Exp	1,2472	3,4688	2,2768	5,6493
	Cal	1,2364	3,4731	2,2830	5,6757
k_{cat} [h]	Exp	41,5732	115,6263	75,8939	188,3084
	Cal	41,5038	115,8099	76,2436	188,6952
K_m/V_{max} [g.L ⁻¹]	Exp	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
	Cal	0,4965	0,4998	0,4991	0,5013
R^2	Exp	0,9780	0,9652	0,9605	0,9892
	Cal	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Quando comparados os resultados da V_{max} para as diferentes condições de hidrólise enzimática do caroço de açaí, se verifica um aumento na velocidade de 1,83 vezes para o CANT60 (13,68 g.L⁻¹) e CANT70 (11,59 g.L⁻¹), e de 1,63 vezes para o CAT60 (9,22 g.L⁻¹) e CAT70 (4,93 g.L⁻¹), sugere que o aumento da temperatura não foi um parâmetro que tenha influenciado no meio reacional, e sim, o tipo de tratamento que foi submetido o caroço de açaí.

Os valores de K_m , correspondem a metade da velocidade máxima para CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70. O menor valor de K_m foi de 1,2472 g.L⁻¹ (CANT60), quanto menor o K_m , maior a afinidade do catalisador pelo substrato e maior a eficiência catalítica da enzima ao sítio ativo (WHITAKER, 1994).

O valor obtido de K_{cat} para o CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70 é de 33,33 vezes maior que a constante de Michaelis-Menten (K_m), pois a velocidade impôs um limite para com que a enzima e o substrato se difundissem para formação do produto.

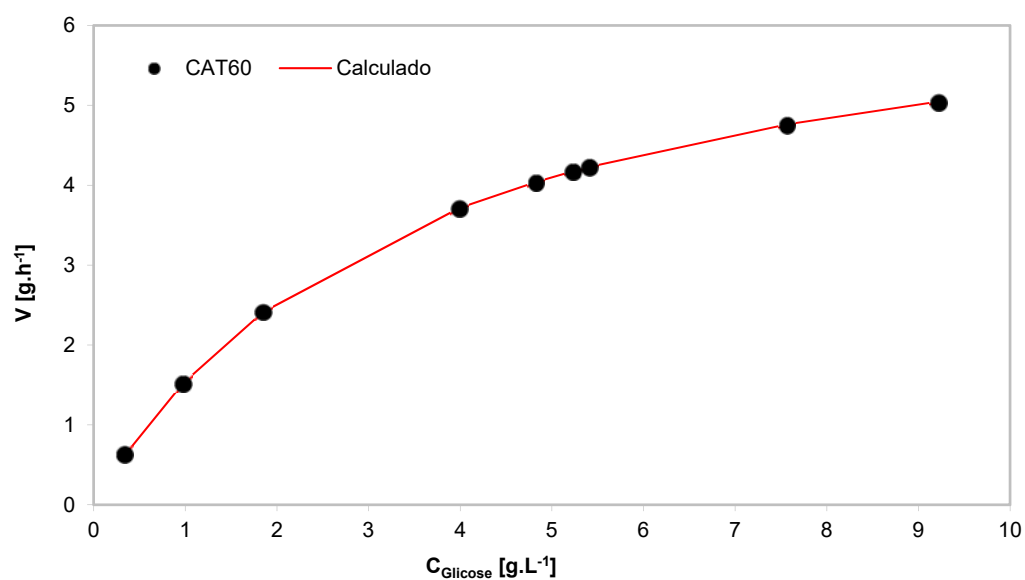
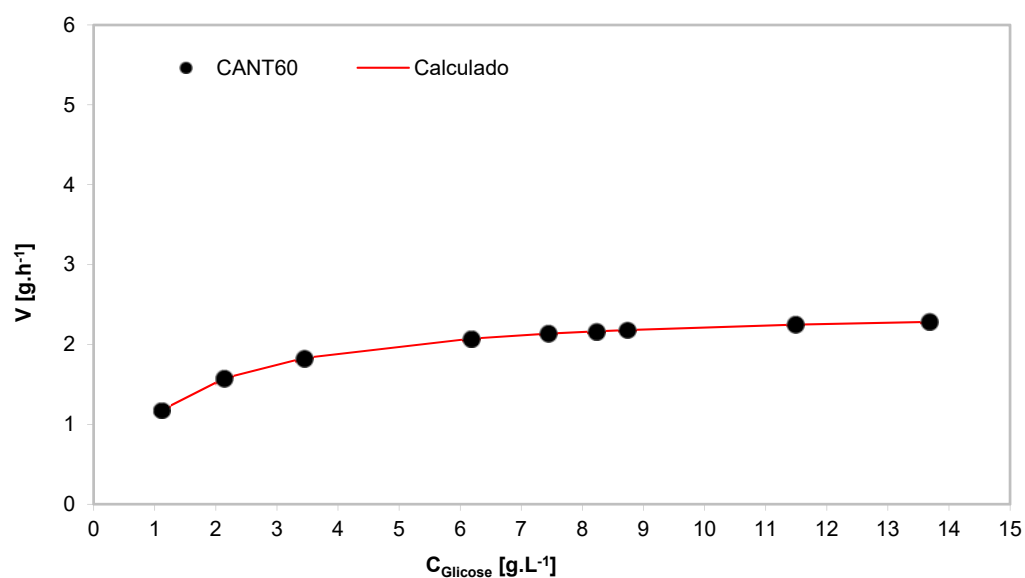
O K_{cat} serve para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima em condições de saturação, pois K_{cat} está relacionado ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo por cada sítio ativo.

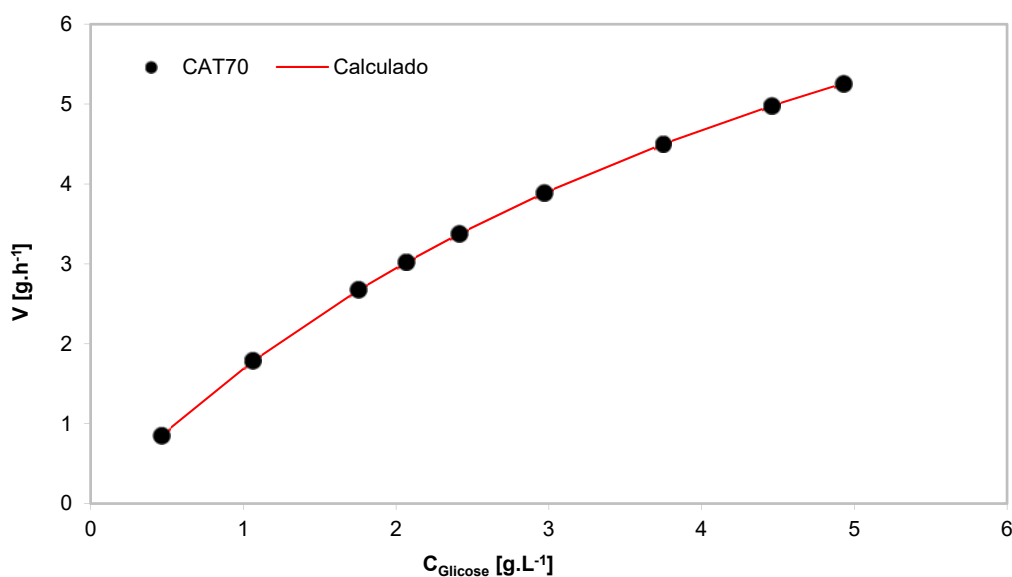
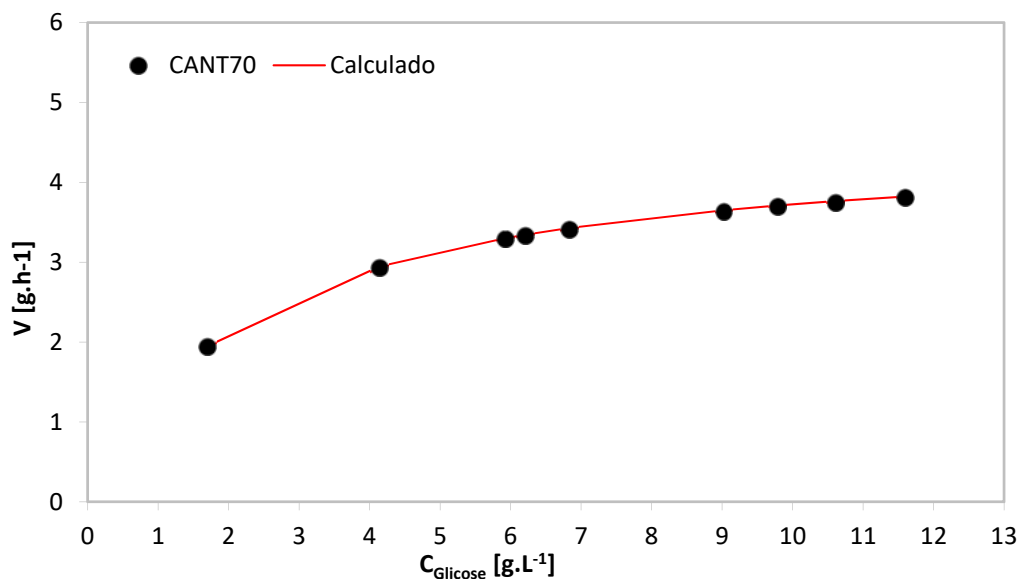
Quando com os valores de K_{cat} é numericamente grande, o equilíbrio está a favor das formas E e S livres. Por outro lado, quando o K_{cat} é numericamente pequeno, o equilíbrio está a favor da formação do complexo ES. Portanto, K_{cat} é inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato, comportamento observado por este estudo.

Os valores obtidos da inclinação (K_m/V_{max}) para as diferentes condições de hidrólise enzimática do caroço de açaí, não foram influenciados pelas condições de trabalho, pois apresentaram a mesma eficiência catalítica da enzima. O coeficiente de correlação (R^2) obtidos nos ajustes dos resultados experimentais ao modelo proposto por Michaelis-Menten foi adequado para representar a cinética de hidrólise enzimática do caroço de açaí nas diferentes condições.

Na Figura 29, são apresentados os perfis cinéticos da hidrólise enzimática do caroço de açaí, de acordo com a equação de Michaelis-Menten, ajustados pelo método dos mínimos quadrados, para as diferentes condições.

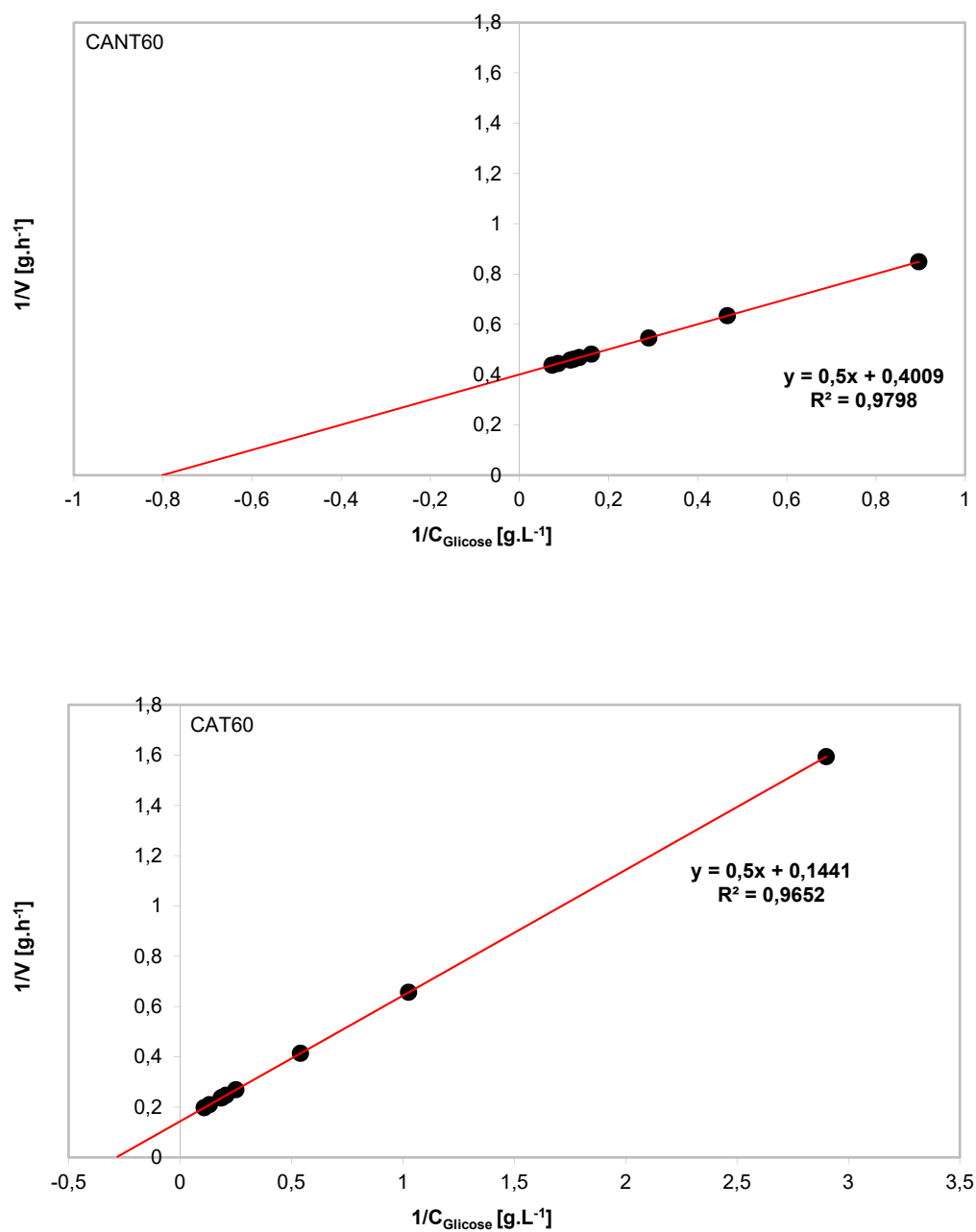
Figura 29. Representação da curva cinética da hidrólise enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70)

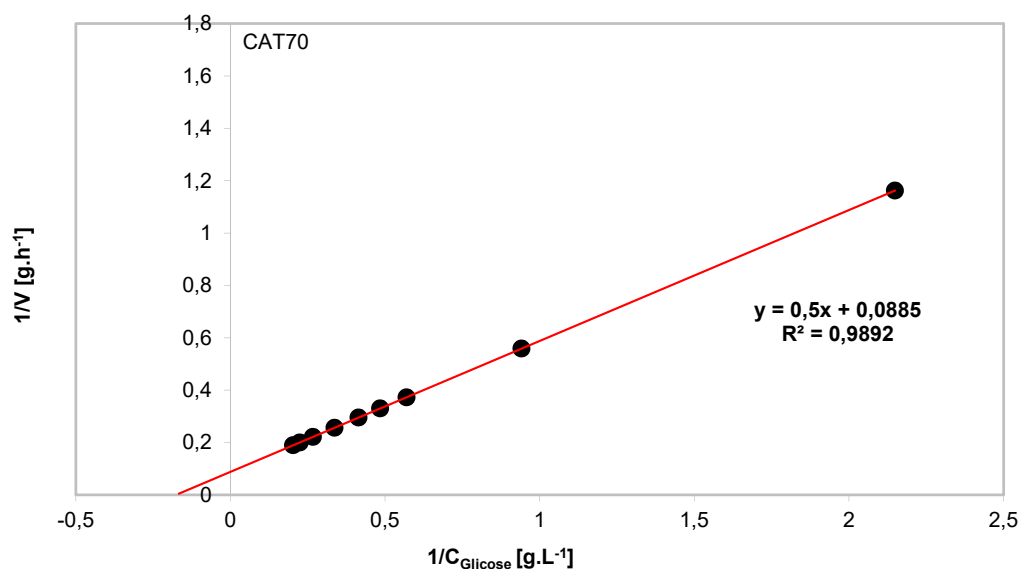
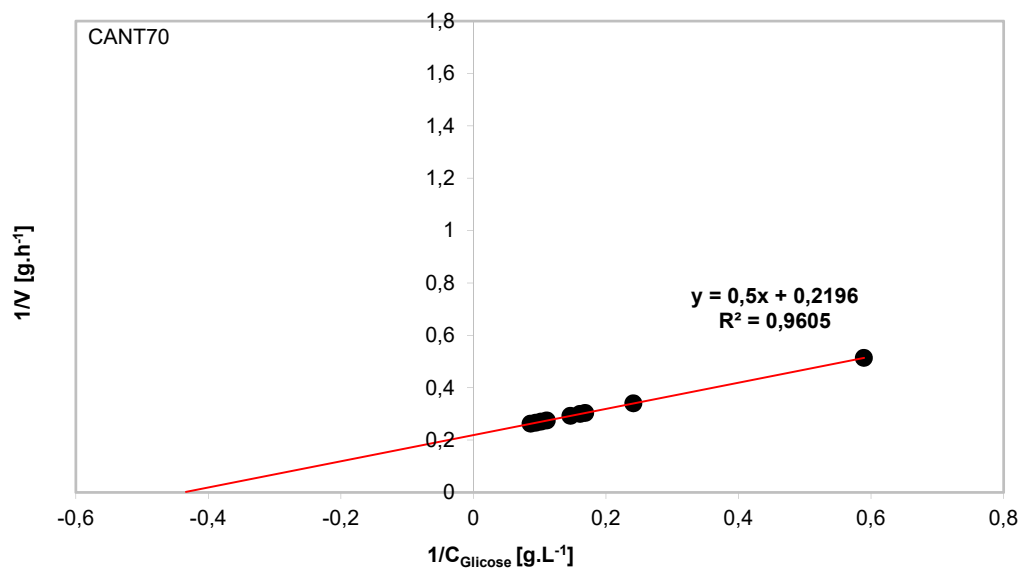




A determinação da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima foram calculadas pela representação gráfica de Lineweaver-Burk, permitindo estimar a inclinação da reta ($K_m/V_{\text{max}} = 0,5$), o valor do ponto de intercepção no eixo y ($1/V_{\text{max}} = 0,4009, 0,1441, 0,2196$ e $0,0885$) que pode ser observado nas equações da reta (Figura 30) e a extrapolação dos dados experimentais ($-1/K_m = -0,8018, -0,2883, -0,4392$ e $-0,1770$).

Figura 30. Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da cinética enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70)



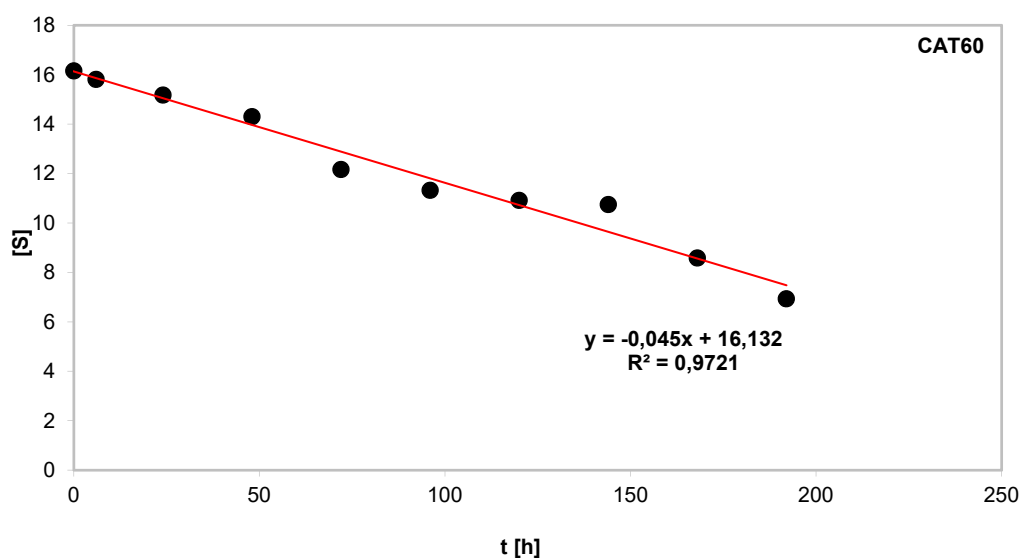
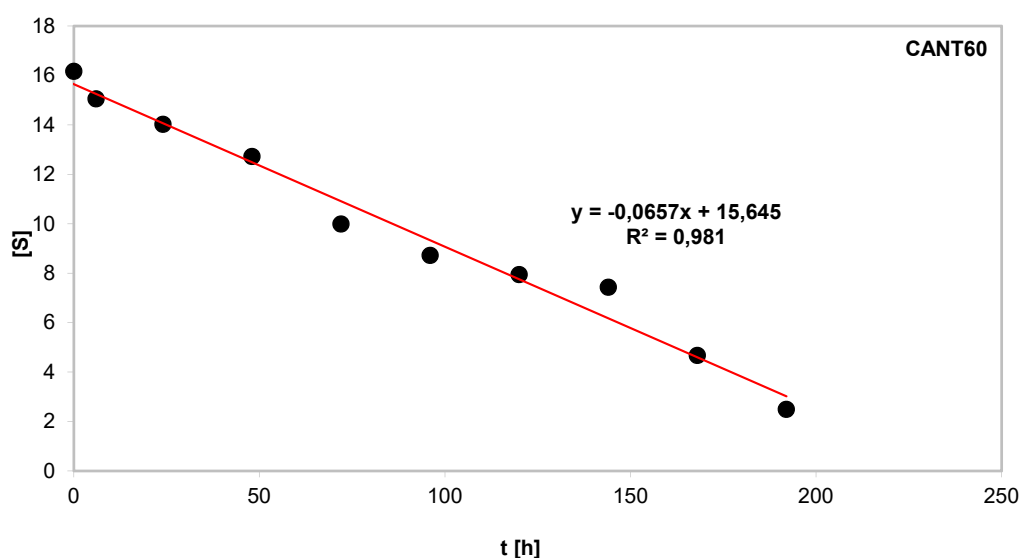


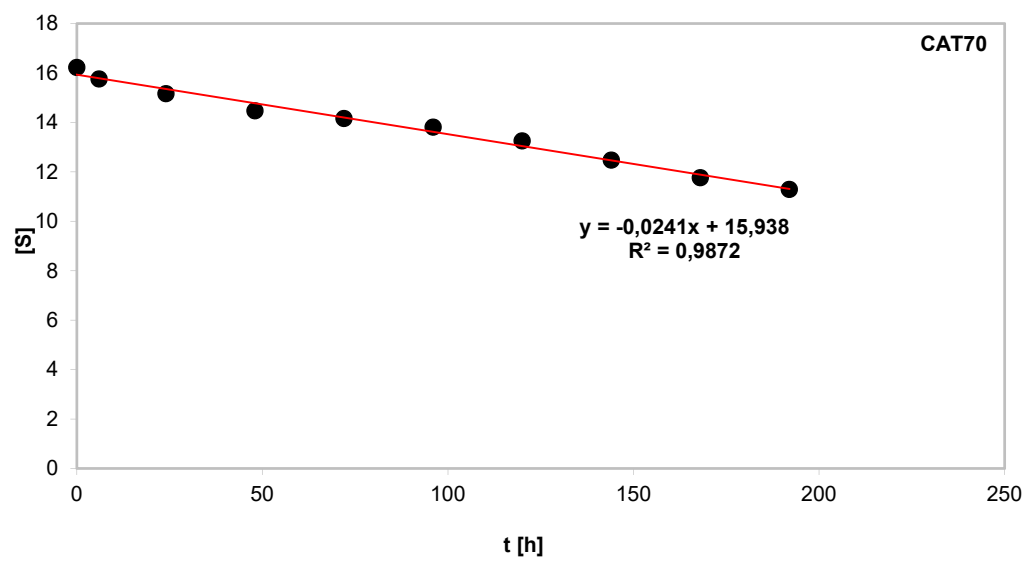
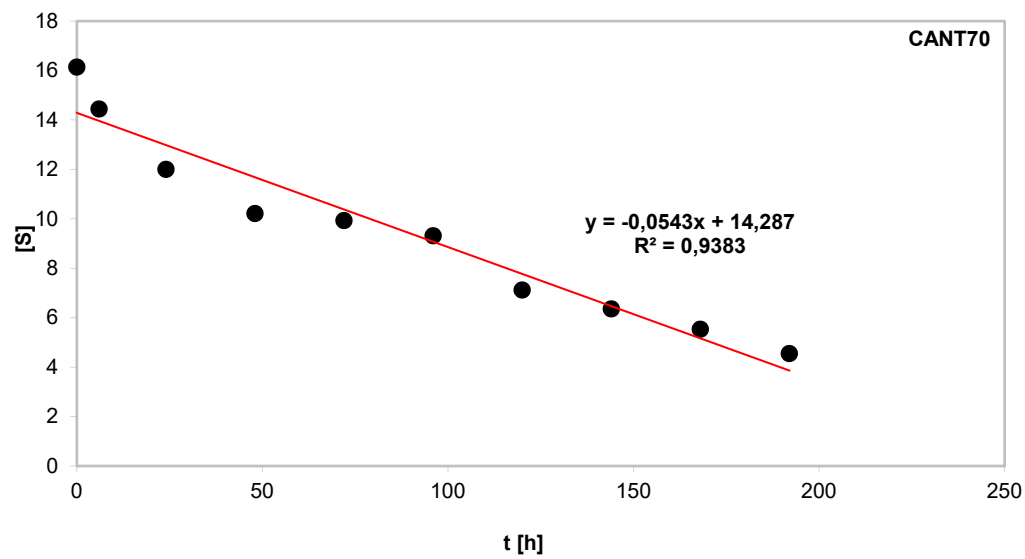
Embora apresente algumas desvantagens em relação a outras linearizações da equação de Michaelis-Menten, este método permite-nos determinar K_m e $V_{\text{máx}}$ com muito mais rigor que a curva de v_0 em função de $[S]$, permitindo ainda visualizar rapidamente o comportamento cinético da enzima em estudo. A maior desvantagem desta linearização é que a maioria dos valores experimentais são realizados com $[S]$ relativamente elevadas e ficam acumulados no lado esquerdo do gráfico. Por outro

lado, para $[S]$ relativamente baixas, pequenos erros de v_0 transformam-se em erros muito maiores de $1/V$, o que pode originar grandes erros de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$.

A ordem de reação das cinéticas enzimáticas da hidrólise do caroço de açaí (Fifura 31), foi estimando a inclinação da reta à curva do gráfico concentração substrato $[S]$ *versus* o tempo t . O modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi de ordem zero, a inclinação da reta se obteve o valor de k negativo.

Figura 31. Ordem de Reação das cinéticas enzimática do caroço de açaí (CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70)





5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos neste estudo, de hidrolisar o caroço de açaí *in natura* e tratado com solvente para a produção de açúcar fermentescível, para produção de bioetanol, as seguintes conclusões são apresentadas.

Os valores da composição físico-química do caroço de açaí *in natura*, estão de acordo com os valores apresentados na literatura.

A análise morfológica do caroço do açaí *in natura* por microscopia eletrônica de varredura (MEV), permitiu fazer uma análise da estrutura e da presença de elementos químicos (C, O, Si e Al) no caroço e na fibra.

O extrato etanoico do caroço de açaí apresentou capacidade antioxidante de 82%, frente ao radical livre DPPH. Novos estudos necessitam ser conduzidos em busca do isolamento, da purificação e identificação dos compostos ativos da planta, bem como, para confirmar sua ação antioxidante, *in vitro*, usando outros radicais livres.

A presença de lignina na hidrólise do caroço de açaí não deslignificado (CANT) não foi um fator limitante ao acesso as enzimas e, conseqüentemente, a presença de compostos fenólicos provenientes da presença de lignina no hidrolisado não desfavoreceu a conversão de celulose em glicose, o rendimento em relação a massa da amostra ficou acima de 25%, nas duas condições de temperaturas (60 e 70 °C).

O tratamento com solvente do caroço de açaí, não contribuiu significativamente na conversão de celulose em glicose, o rendimento em relação a massa da amostra ficou abaixo de 25%, nas duas condições de temperaturas (60 e 70 °C).

Os resultados apresentados sugerem que o tratamento com solvente, não foi capaz de desestruturar a parede vegetal da biomassa, em especial, celulose, hemicelulose e lignina, tornando os açúcares fermentescíveis disponíveis no processo de hidrólise enzimática, devido aos possíveis inibidores gerados no tratamento com solvente.

O caroço de açaí sem tratamento (CANT60) mostrou ser uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol de segunda geração, por conter

um alto teor de celulose (40,29%), além de apresentar bons rendimentos na liberação de glicose (13,687 g.L⁻¹) após a hidrólise enzimática.

A glicose (13,687 g.L⁻¹) obtida pela hidrólise enzimática do caroço de açaí foi bem assimilada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol.

Os parâmetros V_{max} e K_m obtidos nos ajustes cinéticos da hidrólise enzimática do caroço de açaí para CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70 foram: V_{max} igual a 2,4944, 6,9376, 4,5536 e 11,2985 (g.L⁻¹.h⁻¹); K_m igual a 1,2472, 3,4688, 2,2768 e 5,6493 (g.L⁻¹).

Mediante a análise dos dados referentes as condições experimentais (CA = 40 g.L⁻¹, T = 60 °C, t = 192 h e pH = 4,8) a melhor condição da hidrólise enzimática do caroço de açaí foi o CANT60 com rendimentos de 84,54% em relação a concentração inicial de celulose e de 34,08% em relação a concentração inicial da polpa do caroço de açaí 40 g.L⁻¹).

O etanol obtido após destilação, correspondeu a 87,08% em relação a concentração inicial de glicose (13,68 g.L⁻¹).

5.2 RECOMENDAÇÕES

Aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis no caldo hidrolisado do caroço de açaí, avaliando o uso de diferentes métodos para o incremento da concentração de massa seca do substrato no meio reacional de hidrólise.

Realizar o balanço de massa e de energia e fazer a análise econômica do processo após a sua otimização (maximização do rendimento, produtividade e eficiência).

Realizar ensaios de hidrólise enzimática em temperaturas abaixo de 60 °C para avaliar as taxas de conversão de celulose em glicose.

Estudar o estudo de escala para a produção de etanol obtido pela hidrólise da biomassa caroço de açaí.

REFERÊNCIAS

- ABASAEED, A. E. Kinetic and process studies on free and solid acid catalyzed hydrolysis of biomass substrates. 1987. 191 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Auburn, Alabama, 1987.
- ADEN, A.; RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEENHAN, J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing concurrent dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Technical Report. NREL/TP-510-32438; Jun. 2002.
- ALTMAN, F.F.A. O caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Belém, Brasil, Instituto Agrônômico. Boletim Técnico n.31, 1956.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.
- AMIRI, H. KARIMI, K.; ZILOUEI, H. Organosolv pretreatment of rice straw for eficiente acetone, butanol, and etanol production. *Bioresource Technology*, v. 152, p.450-456, 2014.
- AULT, A. An introduction to Enzyme kinetics. *Journal of Chemical Education*, v.51, p.381-386, jun. 1974.
- AZUMA, J., ASSAI, T., ISAKA, M., et al. Effects of microwave irradiation on enzymatic susceptibility of crystalline cellulose. *J. Ferment. Technol.*, 63:529–536, 1985.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manage*, v. 52, p. 858–875, 2011.
- BAUDEL, H.M. Hidrólise-Hidrogenação de Hemiceluloses de Bagaço de Cana-deaçúcar com Catalisador de Rutênio. 1999. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Em Engenharia Química - UFPE, Recife, PE, 1999.
- BAUDEL, H.M. Pré-tratamento e hidrólise, III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, Dezembro, 2006.
- BES, R, S., GAS, G, MOLINIER, J., et al. Enhancement of poplar cellulose susceptibility to cellulose enzyme hydrolysis by ozonation. *Ozone Science Eng.*, 11:217–226, 1989.

BNDES e CGEE. Banco Nacional de Desenvolvimento e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro. 314p. 2008.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30. 1995.

CALLEJA, G. B. *On the nature of the forces involved in the sex-directed flocculation of a fission yeast*. *Can. J. of Microbiol.*, v.20, n.6, p.797-803, 1974.

CALZAVARA, B.B.G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. Belém: FCAP. (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5). 103p. 1972,

CAMPBELL, M. K. Bioquímica. Porto Alegre: 3 ed. Artmed Editora, 2000. 751p.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S.S.; SILVA, J. B. A; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M. FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia. *Revista Analytica, Lorena*, n.44, p. 48-54, jan. 2010.

CARVALHO, L. C. V. Açúcar e Álcool. Sobre energias renováveis. *Revista Opiniões*. Editora WDS: Ribeirão Preto-SP, mar 2008.

CARVALHO, M. Lucas de. Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CEJUP, 271p.; 1991.

CHAPLIN, M. Sources of enzymes, 2004. Faculty of Engineering, Science and the Built Environment. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sources.html>>. Acessado em 12 fev 2016.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Enzimas: ferramentas indispensáveis num mundo vivo. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf>>. Acessado em 12 fev 2016.

COELHO, J.C. Biomassa - Biocombustíveis - Bioenergia. Brasília, Ministério das Minas e Energia. 100p.; 1982.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1262p., 1981.

DAUGULIS, A. J.; SWAINE, D. E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.29, p.639-645, 1987.

Demirbas A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, 27: 327-337, 2005.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, 27: 327-337, 2005.

FARID, M. A., SHAKER, H. M., EL-DIWANY, A. I. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:421 – 424, 1983.

FELSSNER K. S.; TODESCO H.; NETO P. B.; SATO J.; PUTAROV T. C.; VASCONCELLOS R. S.; CARCIOFI A. C. CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DO AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Mart.) COMO INGREDIENTE EM ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES (Dados preliminares) - XIV CONGRESSO CBNA PET CBNA – Ribeirão Preto, SP, 25 e 26 de março de 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter De Gruyter. P. 613. Berlin, 1989.

FERREIRA, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada. 2005. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2005.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; BOGELŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, v.101, n.13, p.4775–4800, 2010.

GURGEL, L. V. A. Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HAHN-HAGERDAL, B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M. F., Liden G., Zacchi G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24:549-556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24, 2006.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from ignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and longterm. *Biomass and Bioenergy*, v.28, p 384-410, 2005.

HODGE, W.H. Palm cabbage. *Principes*, v.9, p. 124-131, 1965.

HSU, T. Pretratament of biomass in: Handbook on bioethanol production and utilization. Wyman C.F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, 197-165, 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da extração vegetal e da silvicultura, Rio de Janeiro–RJ. v.29, p.1-56, 2014. Disponível em:

http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2014_v29.pdf. Acesso em: 15 jan. 2016.

INFANTE, F. S.; VEIRAS, G. P. Aprovechamiento de la Biomassa Forestal producida por la Cadena Monte-Industria. Parte I: Situação actual y evaluación de sistemas de tratamiento. Revista CIS-Madera, n.10, p. 6-25, 2003.

JACKMAN, E. A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. Biotecnología básica. Zaragoza: Acríbia, 577p., 1991.

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

JONES, D. L. Palms: throughout the word. Washington: Smithsonian Institution, 410 p., 1995

KARAGÖZ, P.; ROCHA, I.V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and Co-fermentation. Bioresour. Technol., n. 104, p. 349–357, 2012.

KARIMI, A.; TAGHIYARI, H.R.; FATTAHI, A.; KARIMI, S.; EBRAHIMI, G.; TARMIAN, A. Effects of Wollastonitenanofibers on biological durability of poplar wood (*Populus nigra*) against *Trametes versicolor*. Bio Resources, v. 3, n. 8, p. 4134- 4141, 2013.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH M. J. Ethanol production from dilute acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 138-144, 2006.

KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2002. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais.pdf>. Acessado em 03 jan. 2016.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Potential Inhibitors from wet oxydation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. Biotechnology and Bioengineering., v. 81, p. 738-747, 2003.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. (2009). Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. Biotechnology for Biofuels, v. 2, n. 31. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1. Acesso em janeiro de 2016.

- KOULLAS, D. P.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D., et al. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 39:113 – 116, 1992.
- KRISHNA S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering*, 22, p. 467-470, 2000.
- KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy use in cellulosic ethanol production. *Biotechnonology for Biofuels*, 4:27, 2011.
- LARABIA, C.; MAKSOUDA, W. al; SZETOA, K.C.; ROUBAUDC, A.; ASTELLIC,
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v.56, p.1-24, 1997.
- LEITE, R. C. C.; LEAL M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. *Novos estudos – CEBRAP N. 78*, São Paulo, Julho de 2007.
- LE MOS, J. L. S. Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar. In: *Série Tecnologia Ambiental - CETEM/MCT*. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: Acessado em 03 jan 2016.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. *Álcool carburante: uma estratégia brasileira*. Ed. UFPR, Curitiba, 2002. 248p.
- LIMA, U. A. *Aguardente: fabricacao em pequenas destilarias*. 1a ed. Piracicaba: Fundacao de Estudos Agrarios Luiz de Queiroz, 1999. 187p.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Biotechnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. vol.1, cap.1: Produção de Etanol, p.1-43, 2001.
- LIU, Z. H.; QIN L.; PANG F.; JIN, M. J.; LI, B. Z.; KANG Y.; DALEC, B. E. YUANA, Y. J. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*, v.44, p.176-184, 2013.
- LYND L. R.; ZHANG Y. H. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnology and Bioengineering* 77: p. 467-475, 2002.
- MACEDO, I. C.; SEABRA. J.E.A.; SILVA, J. E.A. R, S. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020”. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 582-595, 2008.

- MARABEZI, Karen. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Universidade Federal de São Carlos p.52, São Carlos. 2009.
- MARCHIORI, J.N.C. Elementos de dendrologia. Santa Maria: UFSM, 163p., 1995.
- MARQUES, S.; SANTOS, J.A.L.; GÍRIO, F.M.; CARLOS ROSEIRO, J. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 210-216, 2008.
- MARTIN, C.; ALRIKKSON, B.; SJODE, A.; NILVERBANT, N.; JONSSON, L.J. Dilute sulphuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136, 339–352. 2007.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:426-432, 2007.
- MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado). Disponível em: . Acessado em 17 out. 2015.
- MELO, E. A.; MACIEL, M.I.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. 2008 - Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.2, p.193-201.
- MES-HARTREE, M. YU, E.K.C., REID, I.D., et al. Suitability of aspenwood biologically delignified with *Phlebia remellosus* for fermentation to ethanol or butanediol. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 26:120 – 125, 1987.
- MILEO P. C. Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis* L.). 2011. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, mai. 2011.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K.; Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results-- *Food Chemistry* 130, 2012, 1036–1043.
- MORRIS, J. G. Físico-química para biólogos. 1ª ed. Ed. Polígono, Editora da USP. São Paulo–SP, 1972. Cap II: Cinética de Reações Catalisadas por Enzimas, p.323-367.
- MUSSATTO, S.I, TEIXEIRA, J.A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbial Biotechnology*, 2010.

Nascimento, W.M.O. 2008. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia. Nº 18, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (2000) *Lehninger – Principles of Biochemistry*, 3rd Edition, Worth Publ., NY.

NEUREITER, M. et al. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 49-58, 2002.

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

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial: novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool. *Revista Pesquisa FAPESP*, São Paulo, n. 122, 2006.

LARABIA, C.; MAKSOUDA, W. al; SZETOA, K.C.; ROUBAUDC, A.; ASTELLIC, P.; SANTINIA, C.C.; WALTERB, J.J. Thermal decomposition of lignocellulosic biomass in the presence of acid catalysts. *Bioresource Technology*, v. 148, p.255–260, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Biosource Technology*, v.74, p.69-80, 2000.

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

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

PIETROBON, V. C. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

PU, Y.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B.H.; RAGAUSKAS, A.J. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments (Review). *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 15, 2013.

PURI, V. P., PERCE, G. R. Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:480 – 485, 1989.

- RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. 2010. 414p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.
- RABELO, S.; FILHO, R.; COSTA, A. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.148, p. 45-48, 2008.
- RAMOS, L. P., NAZHAD, M. M., SANDDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme Microb. Technol.*, 15:821 – 831, 1993.
- ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T.H.S; ALBUQUERQUE, T.L; GONÇALVES, L.R.B; MACEDO, G.R.; LUCIANA ROCHA B. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Journal*, n. 243, p. 234–243, 2014.
- RODRIGUES, F. A. Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas-SP. 2007.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; LEMO, V.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO; COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS - SBPMat, 7., 2008, Guarujá; BRAZILIAN MRS MEETING, 7., 2008, Guarujá. Abstracts. Rio de Janeiro: SBPMat, 2008.
- ROLZ, C., LEON, R., ARRIOLA, M, C., et al. Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fung. *Appl. Environ. Microbial.*, 52:607 – 611, 1986.
- ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *Revista do BNDS*, n. 32. p. 117 – 156, 2009.
- ROWELL, J. K.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S. Characterization and factor effecting fiber properties. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A. AND MATTOSO, L.H.C. (eds): *Natural polymers and agrofibers based composites: preparation, properties and applications*, USP/IQSC Embrapa/CNPiA Botucatu/UNESP, São Carlos. 2000.
- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, vol.27, n.2. São Paulo, 2004. Acessado em 17 out 2015.
- SAEMAN, J. F. Key factors in the hydrolysis of cellulose. In: KLASS, D. L. (Ed.). *Biomass as a nonfossil fuel source*. Washington: ACS. v. 144, p. 185-197, 1981.

- SAKANO K., MIZUTANI M., MURATA M., OIKAWA S., HIRAKU Y., KAWANISHI S., Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage, *Free Radical Biology & Medicine*, 39, p.1041–1049, 2005.
- SANTO, Iris Dias- Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécie lenhosas do cerrado- Departamento de Ciências Florestais. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Universidade de Brasília, 2008.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.
- SILVA E. F. Anatomia de órgãos vegetativos de *Elais guineensis* jacq. (Dendê) afetados pela doença amarelecimento fatal. Brasília, DF, 2009. In: III CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, v. 3, Brasília. Anais XCVIII Brasília, DF, p. 25-26, 2009.
- SILVA, I. T.; ROCHA, B.R.P.; Energia de biomassa, agricultura familiar e inserção social em contribuição ao desenvolvimento sustentável nas comunidades isoladas do Estado do Pará. ANAIS DO SIMPÓSIO AMAZÔNIA, CIDADES E GEOPOLÍTICAS DAS ÁGUAS, 2003. Projeto MEGAM. v. único. p. 172-173.
- SINGH, R.; SHUKLA, A. A review on methods of flue gas cleaning from combustion. *Renew Sustain Energy Rev.*, n. 29, p. 854-864, 2014.
- STRUDWICK, J.; SOBEL, G.L. Uses of *Euterpe oleracea* Mart. In the amazon estuary, Brazil. In: BALICK, M.J., ed. *The palm- tree of life: biology, utilization and conservation*. Advances in Economical Botany, New York, v.6, p. 225-253, 1986.
- SUN Y., CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresurce Technology*. v. 83, p.1-11, 2002.
- SUN, Y. & CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresurce Technology*, v. 96, p. 1599-1606, 2005.
- SZCSODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and bioenergy*, 10(5/6):367 – 375, 1996.
- SZCSODRAK, J., ILCZUK, Z., ROGALSKI, J., et al. Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:504 – 510, 1986.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresurces*, n. 2, p. 707–738, 2007.
- TAKARA, D.; KHANAL, S. K. Biomass pretreatment for biofuel production. In: *Sustainable Bioenergy and Bioproducts*. GOPALAKRISHNAN, K.; VAN LEEUWEN, H.; BROWN, R.. (eds). Springer-Verlag Inc., London, UK, p. 59-70, 2012.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, v.101, p. 4744–4753, 2010.

TOSETTO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. 2002. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2002.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Aplicações de enzimas na indústria têxtil. Disponível em: Acessado em 12 fev. 2016.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, issues 12, 2007.

VIDAL Jr., B. C.; DIEN, B. S.; TING, K. C.; SINGH V. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion - A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.164, p.1405-1421, 2011.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U. de; MÜLLER, C. H.; DIAZ, S. C.; ALMANZA, M. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazonica. 367p. (TCA-SPT,44), 1996.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*. 2ª ed. Printed by John Wiley & Sons Inc. New York – USA. 1995. Section 13 – 2: Enzyme Kinetics, p.351 - 367.

VOET, D.; VOET, J. G. (1995) *Biochemistry*, 2nd Ed. John Wiley, N.Y.

WANG, P. M.; ZHENG, D. Q.; CHI, X. Q.; LI, O.; QIAN, C. D.; LIU, T. Z.; ZHANG, X.Y.; DU, F. G.; SUN, P. Y.; QU, A. M.; WU, X. C. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. *Biotechnol. Bioeng.*, v.1, n. 111, p. 152-164, 2014.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. ed. Davis: University of California, 1994. 625p.

WOLF, Lucia Daniela – Pré-tratamento Organossolve do Bagaço de Cana-de-açúcar para produção de Etanol e Obtenção de Xilooligômeros- São Carlos: UFSCar, 2011.147 f.(Dissertação).

XIANG, Q. Conversion of lignocellulosic substrate into chemicals: kinetic study of dilute acid hydrolysis and lignin utilization. 2002. 163f. Tese (Doutorado) –Universidade de Auburn, Alabama, 2002.

ZALDIVAR, J., Nielsen J., Olsson L. Fuel ethanol production from lignocelullose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 17-34, 2001.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. v. 24, p. 452- 481, 2006.

ZHENG, M.; MOSIER, N. S.; HUANG, C. P.; SHERMAN, D. M.; LADISCH, M. R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioenergy*, v. 97, p. 265-278, 2007.

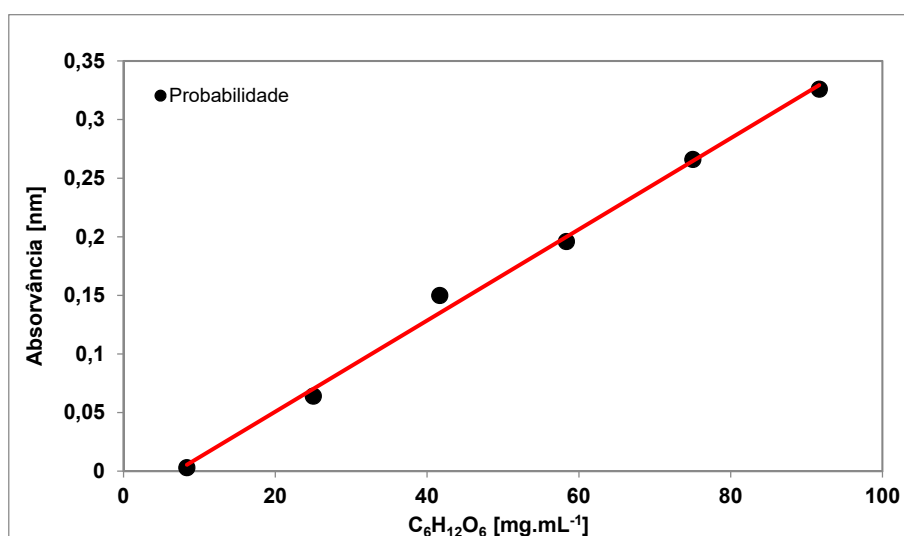
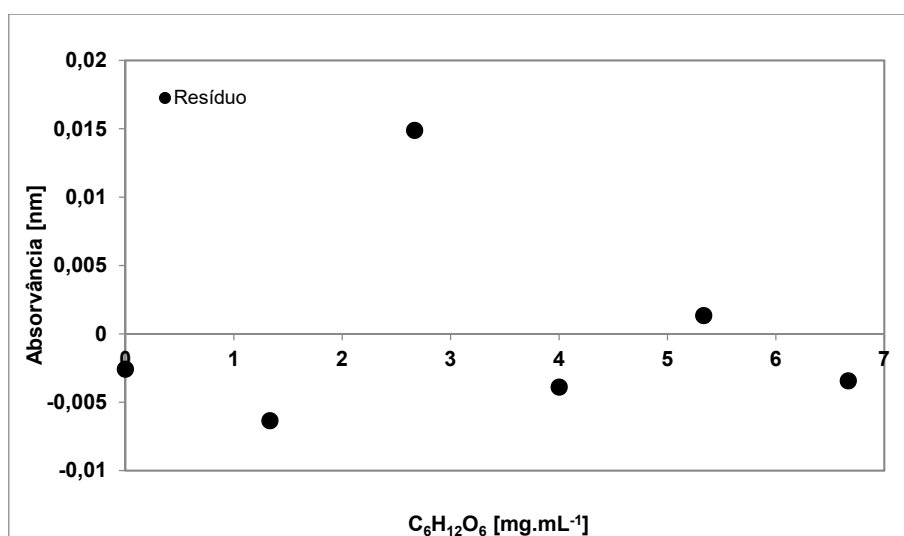
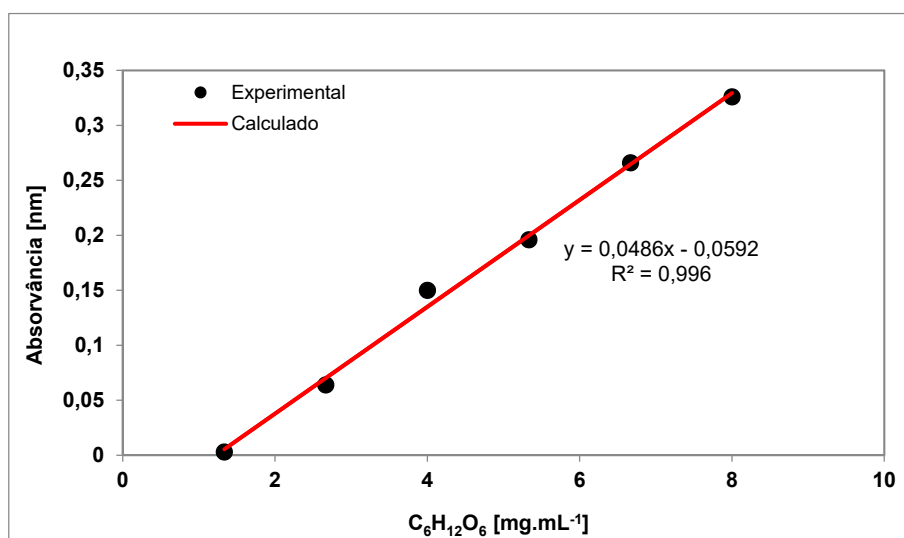
ZUBAY, G. L.; PARSON, W. W.; VANCE, D. E. (1995) *Principles of Biochemistry*, WCB, Oxford.

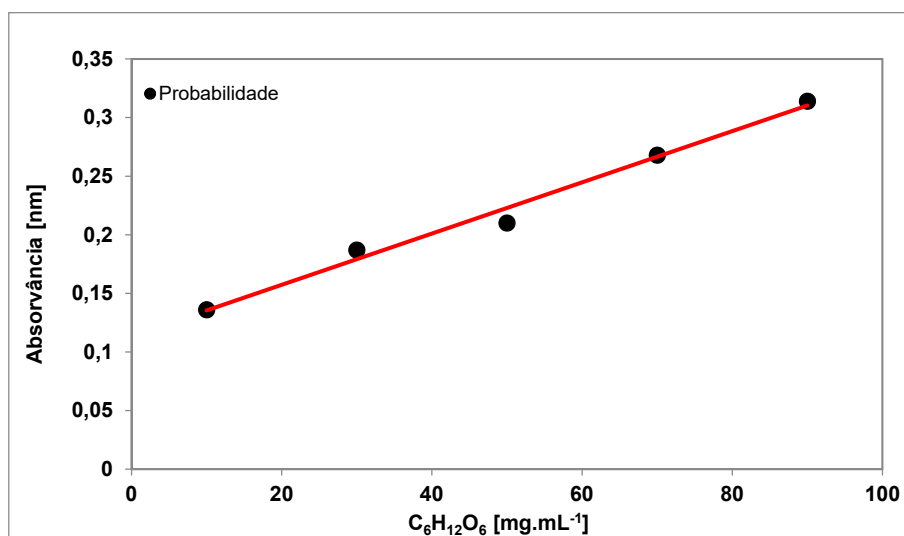
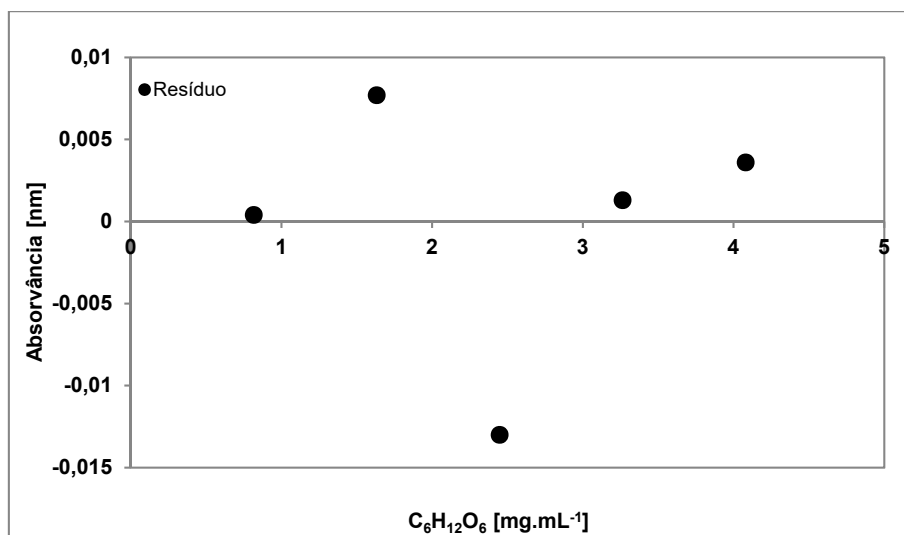
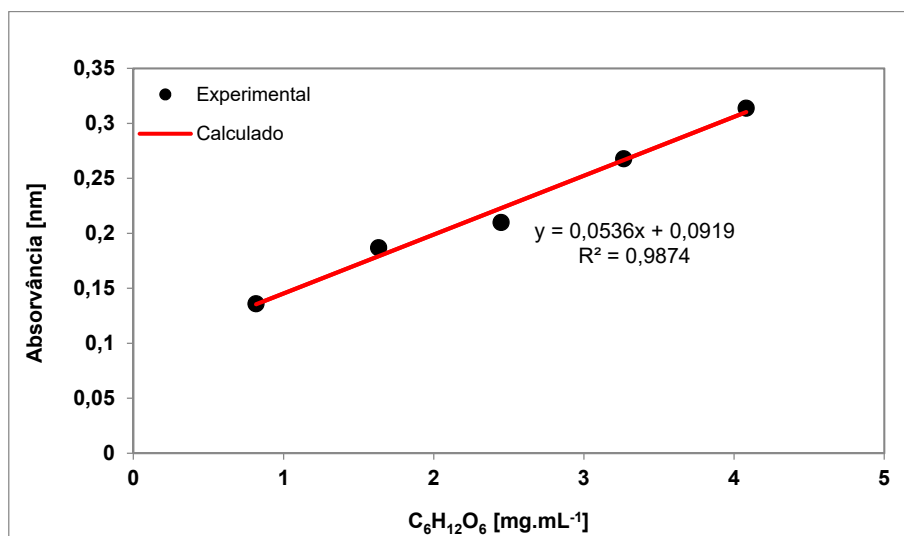
APÊNDICE I - Dados da secagem do caroço de açaí em estufa com circulação de ar
($T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, velocidade do ar de $0,5\text{ m.s}^{-1}$)

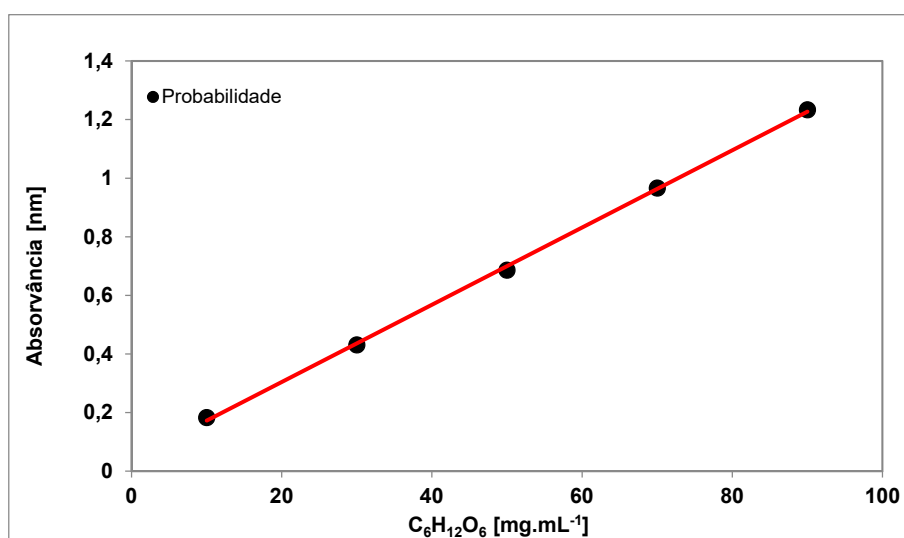
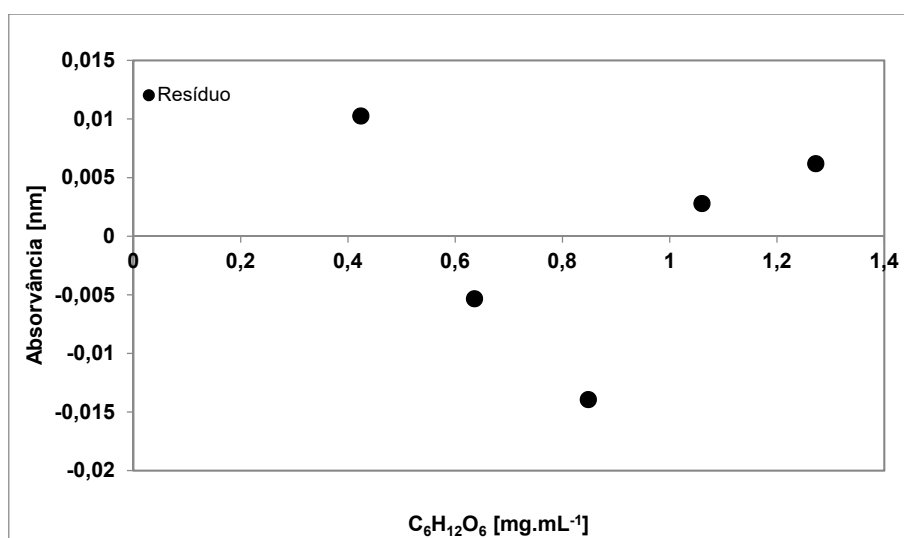
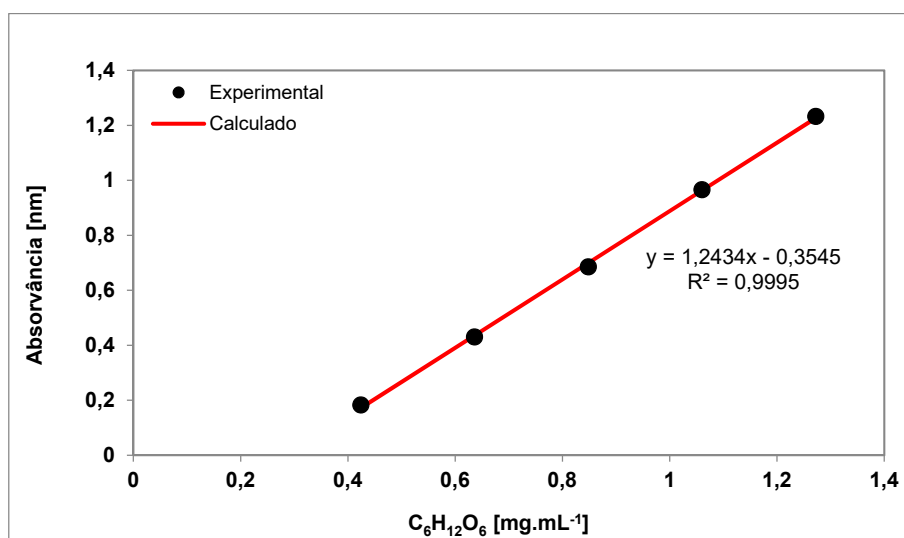
Tempo [h]	m_A [g]	$T_{\text{amb.}}\text{ }[^{\circ}\text{C}]$	Amostra [%]	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ [g]	Umidade [%]
0	19400,00	29,50	100,00	0,00	0,00
2	16134,96	28,50	83,17	3265,04	16,83
4	14077,83	29,00	72,57	5322,17	27,43
6	12647,50	28,00	65,19	6752,50	34,81
8	12182,94	28,00	62,80	7217,06	37,20
10	12144,20	30,00	62,60	7255,80	37,40
12	11929,73	28,50	61,49	7470,27	38,51
14	11825,96	29,00	60,96	7574,04	39,04
16	11794,14	30,00	60,79	7605,86	39,21
18	11757,82	29,50	60,61	7642,18	39,39
20	11751,59	29,50	60,58	7648,41	39,42
22	11733,60	30,00	60,48	7666,40	39,52
24	11720,11	30,00	60,41	7679,89	39,59

m_A = Massa da amostra

APÊNDICE II – Curvas de calibração de glicose I







APÊNDICE III – Métodos Para Determinação da Atividade Enzimática

1. Solução Tampão de Citrato (pH = 4,8)

Dissolver, 10,5 g de ácido cítrico monohidratado em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionar hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,3 (aproximadamente 2,5 g). O volume da solução foi completado para 50 mL e em seguida, mediu-se o pH. Quando necessário, foi adicionada solução de hidróxido de sódio à solução para que o pH atingisse 4,5 a 1 mol.L⁻¹. Para obter a concentração de 0,05 mol/L, a solução de 50 mL foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Neste momento o pH subiu para 4,8.

2. Atividade Celulolítica (Método do ART)

As atividades enzimáticas de celulase total (FPase), foram avaliadas segundo metodologia proposta por Miller (1959), Ghose (1987) e Adney e Baker (1996). A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do ADNS e os substratos utilizados foram: Papel de filtro, CMC e Avicel respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera um μmol do açúcar redutor correspondente por minuto nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática dos experimentos foram realizados em triplicata.

3. Atividade Celulolítica (FPU)

Expressa a atividade de celulase total, utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm, aproximadamente, 50 mg) como substrato. A atividade de FPase foi determinada homogeneizando-se 500 μL de amostra, 500 μL de tampão citrato pH 4.8 e uma tira de papel de filtro (1x6 cm). A solução foi mantida a 50°C por 1 h, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, foi adicionado 500 μL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4. Atividade da β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi realizada pelo método de Costons & Loomis (1969), adicionando-se 100 μ L do reagente pNPG (pNP- β -D – glicopiranosideo-Sigma) 15 mM, preparado em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e 100 μ L do sobrenadante de cultura. A reação foi incubada por 1 hora a 50 °C, para cessar a reação, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A leitura foi realizada a 410 nm.

5. Preparação da Solução de DNS

O reagente DNS é preparado através da adição de 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água destilada. Após dissolução total dos sólidos, adicionou-se 306,0 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 mL de fenol (fundido) e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio sendo o volume aferido para 1416 mL com água destilada. Porém, verificou-se que deste modo o reagente sofria degradação se estocado por algum período, mesmo armazenado em frasco âmbar.

Assim, o reagente DNS passou a ser preparado segundo BAZÁN (1993). Dissolveu-se 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. Adicionou-se a esta mistura 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio. O reagente foi guardado em um frasco âmbar para proteger da luz e nomeado como solução mãe de DNS. Para a quantificação dos ART, foram transferidos 100 mL da solução mãe em um béquer sendo adicionados 30,6 g de tartarato de sódio e potássio, submetido a aquecimento até total dissolução dos sólidos. Após dissolução, o volume foi aferido para 146 mL, estando assim a solução pronta para uso.