



MARIA ISABELA RAVANI FERREIRA CORREA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO CAROÇO DE AÇAÍ PARA
A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

**LAVRAS – MG
2023**

MARIA ISABELA RAVANI FERREIRA CORREA

ESTUDO DA OBTENÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO CAROÇO DE AÇAÍ

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Aprovado em 09 de março de 2023.

Prof. Dr. Suellen Mendonça Nascimento (UFLA)
Dr. Angélica Cristina de Souza (UFLA)

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa
Orientador
M.Sc. Karen Santos Silva
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir viver toda essa experiência e por estar comigo ao longo de todo esse caminho, protegendo, abençoando e me dando forças diante às dificuldades.

A minha mãe, Elysângela, por ser minha inspiração e minha fortaleza, me ajudando a seguir em frente, nunca desistir e por sempre me incentivar nos estudos. Obrigada por ter vivido cada passo desse sonho comigo. Ao meu pai, Sérgio Adriano, que sempre me acolheu e esteve presente em todas as fases da minha vida com seu otimismo.

A minha avó, Maria da Penha, por todo o cuidado e carinho, por todas as orações que me ajudaram a chegar até aqui. Ao meu avô, José, que sempre me emponderou, me incentivou nos estudos e me ensinou sobre a importância do trabalho e honestidade.

A minha tia, Elysandra, que me ensinou sobre força e determinação. Aos meus primos, Gabriel e Matheus, companheiros de casa, que dividiram comigo momentos bons e ruins longe de casa, vocês fizeram essa trajetória muito mais legal.

A minha tia Vivian e minha amiga Layla, que me apresentaram Lavras e à UFLA, e cuidaram tão bem de mim, com todo seu amor e carinho, durante essa graduação.

A minha primeira amiga, Socorro, que cuida tão bem de mim e está sempre pronta para ajudar. A minha amiga, Yasmin, amizade de infância que amadureceu, aprendo muito com você, irmã. As amigas que fiz em Lavras e tornaram essa trajetória mais feliz, Luana, Luiza e Paula, vocês são meu lar longe de casa. Ao meu amigo, João Gabriel, que dividiu comigo a saudade de casa e as dificuldades da graduação.

Ao meu namorado, Gilberto, por todo o companheirismo, nos momentos bons e principalmente, nos ruins. E a sua família que me acolheu.

Ao G-óleo, responsável por grande parte do meu desenvolvimento pessoal, profissional e acadêmico, que despertou meu interesse por biocombustíveis. Que essa entidade cresça cada vez mais.

A minha coorientadora Karen, que me guiou durante a pesquisa, foi minha companheira durante longas horas no laboratório, que me apresentou a vida acadêmica e os desafios de ser um pesquisador.

Ao meu orientador, Luciano, que abraçou o tema e não mediu esforços para realizar os experimentos e acompanhou cada passo desse trabalho.

À UFLA e ao corpo docente, por me guiar ao caminho do conhecimento e formar profissionais extremamente capacitados. Vocês foram fundamentais.

*“me levanto
sobre o sacrificio
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para tornar essa montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além
- legado” (Rupi Kaur)*

RESUMO

O bioetanol surge como uma alternativa aos combustíveis fósseis, visto que ele possui fonte renovável através de matéria-prima vegetal. Sendo assim, este trabalho objetivou Avaliar o potencial do caroço de açaí como matéria-prima para obtenção do etanol de segunda geração. Foram realizadas as etapas de pré-tratamento, secagem e moagem, hidrólise enzimática com a enzima celulase e processo fermentativo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200. O processo de hidrólise enzimática, foi conduzido com 10% e 20% de biomassa (base seca) e atividade enzimática de 10 FPU/g_{biomassa} e 20 FPU/g_{biomassa}. A partir das análises, observou-se que a condição 20% - 10 FPU/g_{biomassa}, apresentou os melhores resultados na etapa de hidrólise. Pois, após a quantificação de açúcares no hidrolisado, encontrou-se uma concentração de glicose de 10,994 g/L. Na etapa de fermentação, a condição 10% - 10 FPU/g_{biomassa} chegou ao final sem concentração de glicose, indicando que o microorganismo consumiu todo o substrato disponível. E a condição de 20% - 10 FPU/g_{biomassa} apresentou uma redução de 77% na concentração de glicose. Por fim, concluiu-se que o caroço de açaí é uma biomassa com potencial para produção de bioetanol, entretanto se faz necessário estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Fermentação. Celulase. Biomassa. Glicose. Levedura. Biocombustível.

ABSTRACT

Bioethanol emerges as an alternative to fossil fuels because it has a renewable source through plant raw material. Thus, this work aimed to study the potential of açai pit as raw material for obtaining second generation ethanol. The stages of pretreatment, drying and grinding, enzymatic hydrolysis with the cellulase enzyme and fermentative process were performed with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The stages of pretreatment, drying and grinding, enzymatic hydrolysis with the cellulase enzyme and fermentative process were performed with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Conditions of 10% and 20% of biomass (dry basis) and enzymatic activity of 10 FPU/g_{biomass} and 20 FPU/g_{biomass}. From the analyses, it was observed that the condition 20% - 10 FPU/g_{biomass}, presented the best results in the hydrolysis stage. After the quantification of sugars in the hydrolyzed, a glucose concentration of 10.994 g/L was found. And the condition of 20% - 10 FPU/g_{biomass} showed a 77% reduction in glucose concentration. Finally, it was concluded that açai pit is a biomass with potential for bioethanol production, however further studies are needed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose	5
Figura 2 – Reação de hidrólise da celulose	6
Figura 3 – Estrutura molecular da hemicelulose	6
Figura 4 – Precursores primários da lignina.....	7
Figura 5 – Quantidade em toneladas e valor da produção de açaí de 2015 a 2020.....	9
Figura 6 – Carço de açaí	9
Figura 7 – Anatomia do fruto do açaizeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Endocarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Pericarpo + Tegumento e (6) Mesocarpo.	10
Figura 8 – Comparação entre SHF e SSF.....	15
Figura 9 – Erlenmeyer com hidrolisado	19
Figura 10 – Erlenmeyer contendo o mosto.....	20
Figura 11 – Tubos de ensaio com variadas concentrações de glicose.....	21
Figura 12 – Placa utilizada leitura no espectrofotômetro	21
Figura 13 – Curva de calibração de glicose para quantificação de açúcares.....	22
Figura 14 – Contagem de leveduras vivas no microscópio após 48h de reação	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de etanol da safra 2020/21 total em mil m ³	4
Tabela 2 – Composição média do caroço de açaí (g/100g em base seca)	10
Tabela 3 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática.....	14
Tabela 4 – Avaliação de diferentes condições operacionais durante a etapa de hidrólise enzimática.....	19
Tabela 5 – Concentração e leituras de absorvância utilizadas na construção da curva de calibração.....	22
Tabela 6 – Valores de absorvância à 540nm das amostras com 10% de BS.....	23
Tabela 7 – Valores de absorvância à 540nm das amostras com 20% de BS.....	23
Tabela 8 – Concentração de glicose em g/L no hidrolisado nas amostras com 10% de BS. ...	24
Tabela 9 – Concentração de glicose em g/L no hidrolisado nas amostras com 20% de BS. ...	24
Tabela 10 – Valores de absorvância do fermentado lido à 540nm.....	26
Tabela 11 – Concentração de glicose em g/L no fermentado.....	26

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Objetivos	2
1.1.1.	Objetivos específicos	2
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1.	Produção de Etanol no Brasil.....	4
2.2.	Matéria-prima para bioetanol.....	5
2.2.1.	Celulose	5
2.2.2.	Hemicelulose	6
2.2.3.	Lignina	7
2.3.	Açaí como matéria-prima para produção de bioetanol	8
2.3.1.	Caracterização do caroço de açaí.....	9
2.4.	Processo de produção de bioetanol	10
2.4.1.	Tipos de pré-tratamento	11
2.4.2.	Hidrólise enzimática	13
2.4.3.	Fermentação	16
2.4.4.	Microorganismos fermentadores	17
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1.	Matéria prima: Caroço de açaí.....	18
3.2.	Hidrólise Enzimática.....	18
3.3.	Fermentação	20
3.4.	Quantificação de açúcares redutores.....	21
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1.	Curva de Calibração.....	22
4.2.	Hidrólise enzimática	23
4.3.	Fermentação Alcoólica	25
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

A energia tem extrema importância no planejamento dos países, tendo em vista que, todo o desenvolvimento econômico, melhora da vida cotidiana da sociedade e grande parte dos avanços tecnológicos são devido o potencial energético de cada país (ARAUJO; NAVARRO; SANTOS, 2013).

Entretanto, grande parte da energia consumida no mundo, seja no uso de veículos, ou usos industriais, ainda provém de fontes não renováveis, como por exemplo o petróleo e o carvão mineral. Essa dependência coloca inúmeros países do mundo em situação de risco, uma vez que tais combustíveis podem se esgotar no longo prazo. Além disso, dependendo da disponibilidade há oscilação dos preços nos mercados internacionais, afetando inclusive todos os seus derivados (ARAUJO; NAVARRO; SANTOS, 2013).

Tendo em vista esse cenário, os biocombustíveis se apresentam como uma tecnologia capaz de fazer frente aos desafios energéticos, pois além de reduzir a dependência externa de petróleo, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. Entre os principais biocombustíveis utilizados atualmente, temos o etanol.

Desde os anos 1920 o etanol é utilizado como combustível no Brasil, mas apenas, a partir de novembro de 1975 com o programa do governo brasileiro intitulado Proálcool, que esse combustível ganhou notoriedade e através de investimentos e subsídios houve um aumento no volume produzido. Esse programa foi motivado pela crise do petróleo de 1973, em que o preço do barril de petróleo subiu significativamente e naquela época o país era totalmente dependente da gasolina derivada do petróleo, e chegava a importar cerca de 80% do petróleo consumido, esse fato trouxe graves consequências para a balança comercial brasileira da época. (LEITE; LEAL, 2017)

Porém, a produção de etanol combustível proveniente principalmente das culturas de cana-de-açúcar, milho e beterraba exigem uma grande área de cultivo, além disso, pode comprometer a segurança no fornecimento de alimentos. E por isso, têm se estudado muitas fontes alternativas para a produção de etanol.

Surgindo então, o etanol de segunda geração ou bioetanol. Algumas das fontes alternativas que mais se destacam para a produção do etanol 2G são o bagaço e palha de cana-de-açúcar e resíduos de milho. Entretanto, qualquer biomassa sólida ou líquida rica em celulose pode ser uma alternativa.

Nesse sentido, surge o caroço de açaí principal subproduto da indústria de processamento de açaí. Fruto da palmeira (*Euterpe oleracea*), o açaí possui cerca de 53,20% de celulose em sua composição, segundo Rodríguez-Zúñiga (2008).

1.1. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o potencial energético na produção de etanol 2G a partir do caroço de açaí. Para isto, realizou-se, em escala de bancada, as etapas de hidrólise enzimática utilizando uma enzima celulase e fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200.

1.1.1. Objetivos específicos

- Realizar a etapa de hidrólise utilizando uma enzima celulase em escala de bancada;
- Realizar a fermentação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA-11;
- Quantificar açúcares fermentescíveis após as etapas e analisar a viabilidade do caroço de açaí para produção de etanol 2G.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A industrialização mundial, necessária para o desenvolvimento, é uma situação que causa preocupação por agravar o problema ambiental, principalmente pela emissão de CO₂ durante a queima de combustíveis fósseis, causando mudanças climáticas e impactos sociais e econômicos. A preocupação com o meio ambiente, contudo, não pode se dissociar da relevância do crescimento econômico para a sociedade.

O desenvolvimento e a preservação do meio ambiente precisam andar em harmonia, para que haja melhoria da qualidade de vida da sociedade, progresso socioeconômico e preservação dos recursos naturais. E por isso a necessidade de fontes renováveis de energia, que sejam novas e alternativas e que garantam o desenvolvimento mundial. Atentando-se ao comprovado esgotamento do petróleo em médio prazo, como também a necessidade de diminuir a quantidade de emissões de gases de efeito estufa, que contribuem com o aquecimento global. (CUNHA; SCALCO, 2013).

É considerada energia renovável todo tipo de energia gerada a partir de recursos naturais. Podemos citar, hídrica, eólica, solar, geotérmica, biomassa, ondas e marés, essas alternativas estão sendo consideradas fundamentais para promover o desenvolvimento sustentável, eliminar a dependência de combustíveis fósseis e avanço econômico. Além disso, esse tipo de energia, emite menos gases que causam o efeito estufa, como o metano e o gás carbônico. (FERREIRA, 2022).

Segundo dados da ANEEL em 2020 o Brasil foi eleito uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo. A matriz em operação no país é composta majoritariamente por energia hídrica com 62,72%, seguida pela fóssil em segundo lugar com 16,81%, eólica ocupando o terceiro lugar com 8,96%, seguida por biomassa com 8,7%, solar com 1,66% e nuclear com 1,14%. Dentre as diversas fontes de energia sustentável, tem-se a biomassa. Que pode ser caracterizada como qualquer matéria orgânica capaz de ser transformada em algum tipo de energia, seja ela térmica, mecânica ou elétrica. Mesmo sendo pouca expressiva na matriz energética atual é utilizada desde os primórdios da civilização humana e possui um enorme potencial de crescimento nos próximos anos.

O Brasil é mundialmente conhecido por sua agricultura que gera empregos, riqueza, alimentos, fibras e agora também bioenergia, através da oferta de biomassa. Tendo em vista que, essa matéria-prima está intrinsecamente ligada aos sistemas integrados de produção agrícola e agroindustrial. Devido a quantidade de terra agricultável com características adequadas de solo, juntamente a condições climáticas e geográficas favoráveis, o Brasil é um

país que apresenta enorme potencial de produção de biomassa para aproveitamento energético, podendo inclusive se tornar líder na agricultura de energia (SANTOS, NASCIMENTO, ALVES, 2017).

Tendo em vista esse cenário, surge o bioetanol, também conhecido como etanol de segunda geração. Sendo obtido via processo de fermentação de biomassa renovável com alto teor de açúcares ou de polissacarídeos à base de amido (SOUZA et al., 2012).

2.1. Produção de Etanol no Brasil

A produção brasileira de etanol é destinada principalmente ao mercado interno. Por ser considerado uma fonte de energia limpa e renovável, o etanol possui grande importância para a sustentabilidade ambiental. A produção de etanol no Brasil está concentrada no Sudeste e Centro-Oeste, que juntos responderam por quase 88% do volume produzido na safra 2021/22 (etanol de cana-de-açúcar e milho) (VIDAL, 2022).

No Brasil a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima usada na produção de etanol, entretanto, o etanol de milho vem ganhando espaço nas últimas safras, isso se deve, principalmente pela baixa quantidade de cana-de-açúcar disponível na entressafra, juntamente com períodos de baixo preço do milho. As principais usinas que possuem tecnologia para produção de etanol de milho então localizadas no Centro-Oeste. Ao comparar as safras 2020/21 e 2021/22, há um aumento de 15% da produção de etanol de milho e acredita-se que haverá um aumento de 30% para a safra 2022/23. Sendo assim, o etanol de milho irá representar 15% do total da produção nacional, cerca de 4,5 bilhões de litros (VIDAL, 2022). A Tabela 1 apresenta os dados da safra 2020/21 dos maiores estados produtores e o total de produção do país.

Tabela 1 – Produção de etanol da safra 2020/21 total em mil m³

Estado	Volume (mil m ³)
São Paulo	14426
Goiás	5241
Mato Grosso	3326
Minas Gerais	3059
Mato Grosso do Sul	2864
Paraná	1261
Brasil	32503

Fonte: Vidal, 2022

2.2. Matéria-prima para bioetanol

A conversão de biomassas agroindustriais em bioetanol com consequente valorização de rejeitos e resíduos, tem sido objeto de estudos de várias pesquisas realizadas no Brasil e no mundo.

Segundo ANEEL (2008), todo tipo de matéria-prima de origem orgânica que possa ser transformada em energia pode ser classificada como biomassa. Além disso, essa matéria-prima possui diversas origens e pode ser classificada como florestal (madeira), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) ou oriunda de rejeitos urbanos ou industriais, sólidos ou líquidos.

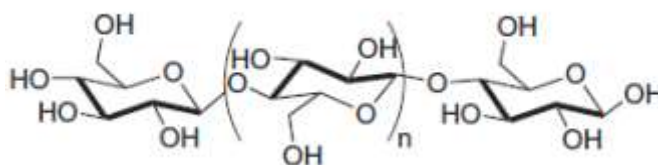
O lugar de destaque é ocupado pelos rejeitos e os resíduos agrícolas ricos em materiais lignocelulósicos por estar facilmente disponível. A biomassa lignocelulósica é composta em sua maioria por celulose, cerca de 40 a 60%, seguido de 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 25% de lignina (MOREIRA, 2005).

A disponibilidade de rejeitos industriais e agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho, tem chamado atenção para a possibilidade de utilização como biomassa para a produção de etanol de segunda geração. Esse biocombustível se diferencia do etanol de primeira geração, principalmente, pela necessidade de realização de uma etapa anterior a fermentação, a etapa de hidrólise dos polímeros de celulose e hemicelulose em açúcar fermentescíveis (MOJOVIC et al., 2006; SASSNER et al., 2006; SHARMA et al., 2007).

2.2.1. Celulose

A parte celulósica é composta de cadeias de celulose que se trata de um polímero linear de cadeias não ramificadas de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β 1-4 com alto peso molecular, rígido e com uma alta resistência a tensão (SANTOS, 2020). Ela é responsável por garantir rigidez e firmeza às plantas, além disso, possui inúmeras aplicabilidades. É classificada como um carboidrato do tipo polissacarídeo e ao ser hidrolisada, a celulose dá origem a glicose. Na **Figura 1** podemos ver a estrutura molecular da celulose.

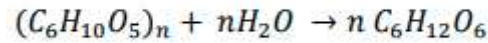
Figura 1 – Estrutura molecular da celulose



Fonte: Santos, 2020

Na Figura 2 podemos ver a equação da celulose se transformando em glicose.

Figura 2 – Reação de hidrólise da celulose



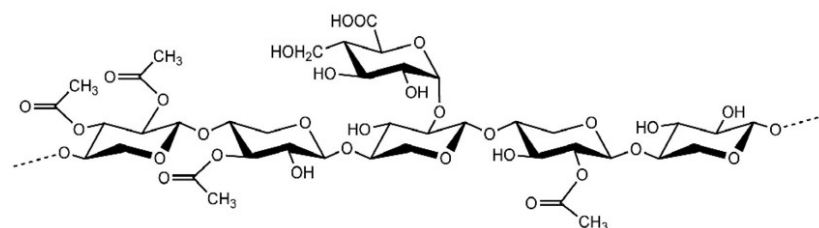
Fonte: Santos, 2020

A celulose pode ser classificada a partir de duas propriedades importantes, são elas: o grau de polimerização que está relacionado a quantidade de ligações glicosídicas disponíveis para a ação da enzima celulase e pode ser definido através do número médio de monômeros e o peso molecular do polímero; e o índice de cristalinidade que se relaciona com a reatividade do substrato (ESTEVES, 2011). Quando acontece a junção da lignina com tais características da celulose, o resultado é uma macromolécula altamente resistente à hidrólise, o que representa um desafio para o uso de biomassas lignocelulósicas em diversas aplicações (ARANTES; SADDLER, 2010).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses apresentam diferentes tipos de açúcares como pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses que formam polímeros de cadeia mais curtas e ramificadas. As hemiceluloses são mais fáceis de serem hidrolisadas quando comparada com as celulosas devido a estrutura ramificada que diminui as energias de ligações, porém a fermentação dos açúcares de cinco carbonos, pentoses, ainda não tem um processo tão desenvolvido como no caso da glicose encontrada nas celulosas. A estrutura da hemicelulose está representada na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura molecular da hemicelulose



Fonte: Santos, 2020

Deve-se sempre lembrar que o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos,

possuindo cada componente propriedades peculiares. Como no caso da celulose e da lignina, o teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas polioses (hemiceluloses) de madeira variam grandemente com a espécie e, provavelmente, também de árvore para árvore (TELEMAN, 2009).

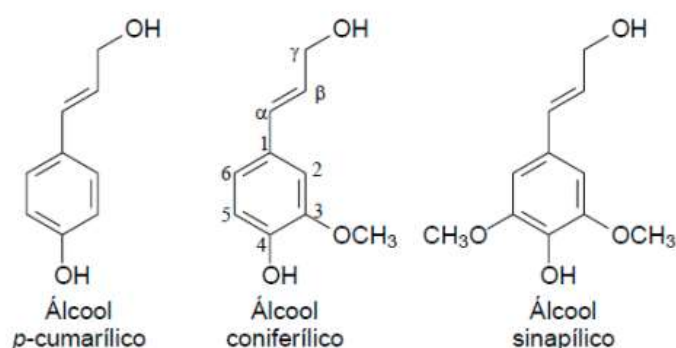
2.2.3. Lignina

A lignina é o segundo polímero natural mais abundante do globo terrestre, representando um total de 30% de todo carbono orgânico não fóssil (SANTOS et al., 2012). Este polímero é considerado um resíduo em diversos processos, como na produção de etanol e na produção de papel e celulose. Isso ocorre devido à sua variedade e complexidade estrutural, o que juntamente com seu alto poder calorífico faz com que a lignina seja comumente destinada à geração de energia.

A lignina representa uma fração de 5-30% da biomassa lignocelulósica (ZHANG et al., 2004), e foi definida por BES (2019) como “material amorfo e polifenólico derivado da polimerização desidrogenativa de três estruturas fenilpropanoides”, sendo estas três estruturas álcool *p*-cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico. A ligação entre estes três monômeros ocorre de forma aleatória com aproximadamente dez tipos de diferentes ligações entre si, originando a lignina na sua forma tridimensional (LEITE, 2016).

Por conta da aderência entre a celulose e a lignina, ela atua nas fibras da biomassa lignocelulósica como um “cimento” (SILVA et al., 2009). Além disso, a lignina não possui uma estrutura homogênea e de acordo com a origem da biomassa há uma variação em sua composição (SANTOS et al., 2012). A Figura 4 apresenta as moléculas precursoras da lignina.

Figura 4 – Precursores primários da lignina



Fonte: Lino, 2015

Para se extrair lignina da biomassa lignocelulósica é preciso utilizar tratamentos, que podem ser físicos e/ou químicos e bioquímicos. Todos os tratamentos buscam a quebra da estrutura polimérica da lignina até que os isolados se tornem solúveis (WANG et al., 2020).

2.3. Açaí como matéria-prima para produção de bioetanol

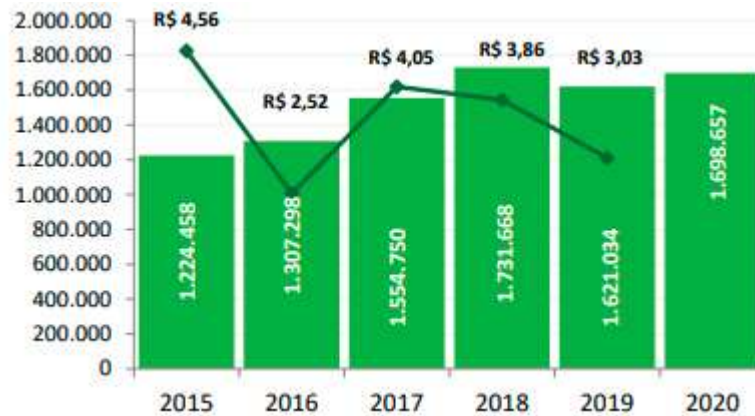
Entre os produtos do extrativismo nacional, o açaí é um dos mais importantes e representa a biodiversidade e importância da Floresta Amazônica. Antes da década de 90, o principal produto de valor agregado do açazeiro era o palmito, extraído da sua palmeira. Entretanto, a partir da década de 90, com a cultura *fitness* e valorização da saúde, o fruto do açazeiro ganhou visibilidade devido suas propriedades antioxidantes e a presença de gordura insaturada em sua composição. Inclusive, hoje o açaí compõe a lista dos super alimentos. (GONZAGA, 2019).

O açaí, cujo nome científico é *Euterpe oleracea Mart.* Pertence à família Arecaceae, que possui cerca de 200 gêneros e 2600 espécies, e em sua grande maioria ocupam áreas tropicais e subtropicais (JONES, 1995).

Segundo uma pesquisa realizada pelo IBGE, a PEVS - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura – PEVS que faz o levantamento de dados sobre produção de culturas de extração vegetal, produção de silvicultura, valor de produção e áreas existentes e colhida dos cultivos florestais, dentro do grupo Alimentícios, o açaí foi destaque e obteve a maior participação no valor de produção (GONZAGA, 2019).

Ainda segundo dados do IBGE, em 2020, a produção de açaí atingiu a quantidade de 1.698.657 toneladas, um aumento de 4,79% quando comparada ao ano anterior, entretanto, ainda inferior ao ano de 2018, que foi o pico de produção de toda a série avaliada na pesquisa, e atingiu cerca de 1.731.668 toneladas. Entre as regiões de destaque, a região Norte do país é a maior produtora e os estados do Pará e Amazonas concentram 87,5% do total. Além disso o estado do Pará é o maior produtor mundial de açaí e maior exportador brasileiro (GONZAGA, 2019). A Figura 5 apresenta a quantidade em toneladas e o valor da produção nacional de açaí dos últimos anos.

Figura 5 – Quantidade em toneladas e valor da produção de açaí de 2015 a 2020



Fonte: IBGE/PEVS + PAM, 2022

2.3.1. Caracterização do caroço de açaí

No processo de despolpa do açaí, segundo o IBGE (2014), 93% do total produzido é resíduo. E esses resíduos ainda não tem uma destinação adequada, e muitas vezes ficam em tornos dos estabelecimentos produtores, ou acabam sendo despejados de forma incorreta nos rios e lixões sem nenhum tratamento. Logo, faz-se necessário estudos que visem o desenvolvimento de uma solução alternativa que aproveitem o potencial desses resíduos.

O caroço é uma semente rica em óleos, formada por um pequeno endosperma ligado a um tegumento e é composto majoritariamente por celulose cerca de 53,20 %, seguido da lignina ocupando 22,30 % de sua composição e 12,26% de hemicelulose (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008). A Figura 6 ilustra o caroço de açaí *in natura*.

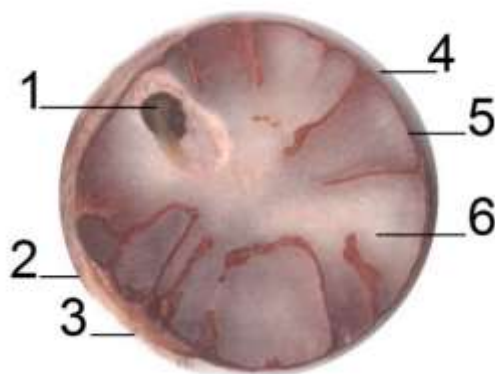
Figura 6 – Caroço de açaí



Fonte: Do Autor (2023)

A Figura 7 apresenta a anatomia do caroço de açaí.

Figura 7 – Anatomia do fruto do açaizeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Endocarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Pericarpo + Tegumento e (6) Mesocarpo.



Fonte: Cordeiro, 2019

A Tabela 2 apresenta a composição média do caroço de açaí, segundo as análises realizadas por Cordeiro et al. 2019.

Tabela 2 – Composição média do caroço de açaí (g/100g em base seca)

	Composição (%)
Umidade	10,15
Lipídeos	0,61
Proteínas	6,25
Fibra Bruta	29,79
Hemicelulose	5,50
Celulose	40,29
Lignina	4,00
Voláteis	0,50
Carbono Fixo	0,83
Cinzas	0,15

Fonte: Adaptado de Cordeiro (2019).

2.4. Processo de produção de bioetanol

A busca por alternativas aos combustíveis de origem fóssil se deu por conta da demanda e o preço, além dos impactos causados por sua combustão que possui impacto negativo para o meio ambiente e trouxe preocupações como o aquecimento global. Entre as alternativas, surgiu o etanol combustível a partir de fontes biológicas (FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012).

Considerado um excelente substituto de combustíveis derivados do petróleo, o bioetanol é um combustível de fonte limpa e renovável, podendo ser obtido através de processos fermentativos de biomassa rica em açúcares ou polissacarídeos que tem como base o amido (SOUZA et al., 2012).

O processo produtivo do etanol celulósico envolve em geral quatro etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise do material pré-tratado, fermentação do hidrolisado e destilação do fermentado.

Para favorecer a ação dos agentes de hidrólise aos carboidratos e aumentar a área superficial para acesso as regiões dos polissacarídeos onde ocorre a fissura da molécula originando os monossacarídeos (hexoses e pentoses) é necessário realizar um pré-tratamento da matéria-prima. A partir do pré-tratamento é possível hidrolisar a lignocelulose e como resultado há uma maior disponibilidade de celulose para a etapa seguinte que é a hidrólise. (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Durante a etapa de hidrólise, que pode ser química ou enzimática, são gerados diferentes tipos de açúcares e são determinados de acordo com composição da biomassa utilizada. Utilizando resíduos vegetais, por exemplo, os principais açúcares obtidos são as pentoses, como a xilose e arabinose, e as hexose, como a glicose. A glicose é frequentemente utilizada para a produção de etanol, através de diversos microrganismos. No entanto, a fermentação de pentoses não é tão comum e pouco se conhece sobre o mecanismo. Visando o alcance de maiores rendimentos e a viabilidade econômica da produção de bioetanol, é recomendado utilizar microrganismos capazes de fermentar todos os açúcares disponíveis e ainda resistir os compostos tóxicos que são gerados como subprodutos da hidrólise (FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012; PARRA-RAMÍREZ; MARTINEZ; CARDONA, 2018).

2.4.1. Tipos de pré-tratamento

A maioria dos carboidratos (celulose e hemicelulose) presentes na biomassa estão dentro da célula, seja como armazenamento de energia, seja como estruturador dos tecidos fibrosos vegetais. Portanto, para a produção de bioetanol é necessário romper a parede celular. Assim, o pré-tratamento visa fundamentalmente o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose. Essa etapa é fundamental para reduzir custos de produção, uma vez que, um pré-tratamento bem-feito é capaz de reduzir a quantidade de enzimas utilizada na etapa seguinte de hidrólise. (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

A etapa de pré-tratamento é capaz de aumentar o rendimento de hidrólise enzimática em até 90%. Quando não se realiza essa etapa o rendimento de açúcar é menor que 20%. Para

considerar o pré-tratamento satisfatório ele deve proporcionar um aumento na formação de açúcares ou favorecer a hidrólise enzimática posteriormente; impedir a degradação dos carboidratos; evitar a formação de subprodutos que podem inibir a conversão nas etapas de hidrólise e fermentação; além de ser viável do ponto de vista econômico (SUN; CHENG, 2002). Nesse sentido, diferentes alternativas tecnológicas têm sido estudadas para ser empregadas como pré-tratamentos, que podem ser divididos em físicos, físico-químicos, químicos e biológicos.

Existe uma grande quantidade de processos de pré-tratamento e estão divididos conforme a tecnologia empregada. Podem ser físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente. Os tipos de pré-tratamento físicos buscam melhorar o desempenho da enzima através do aumento da área superficial, para isso é necessário reduzir o tamanho da partícula utilizando processos como a moagem, através dessa operação também é possível reduzir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. Os pré-tratamentos químicos podem ser ácidos, alcalinos e oxidativos. E a depender do composto químico utilizado há um mecanismo de reação que altera a estrutura da parede celular e resulta numa melhor acessibilidade da enzima (PETRI; OGEDA, 2010).

Apesar da grande variedade de métodos propostos como pré-tratamentos para o processo de hidrólise, os estudos têm mostrado que estes processos sempre geram compostos secundários. Estes compostos inibem a atividade fermentativa dos microrganismos e, em especial, da levedura (ROSSELL, 2006).

De acordo com Dominguez (2003), esses produtos de degradação com potencial inibidor se agrupam em três categorias: derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos.

Originados na degradação dos açúcares originados na hidrólise da hemicelulose estão os derivados do furano, em destaque: o furfural, que tem origem a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5- hidroximetilfurfural (5-HMF), que tem origem na degradação de hexoses (glicose, manose e galactose) (PINTO, 2010).

Os processos de degradação e polimerização dos furfurais e HMF originam a categoria dos ácidos alifáticos, dentro da categoria, podemos citar o ácido fórmico e o ácido levulínico. Durante a etapa de pré-tratamento a degradação de lignina da origem aos compostos fenólicos. Tais compostos são bastante complexos e abrangem uma variedade de substâncias que podem ser encontrados na forma de monômeros, dímeros. Entre eles o ácido 4- hidroxibenzoico, seringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído e os ácidos salicílico, vanílico, siríngico, gentísico entre outros (PINTO, 2010).

Ainda não se conhece completamente os mecanismos de ação e a consequência da presença desses subprodutos sobre a levedura no processo fermentativo, mas já se sabe que eles podem reagir com moléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e causar a perda da seletividade devido aos danos à membrana celular, e ainda possui efeito inibitório sobre as enzimas glicolíticas e fermentativas. Portanto, essas substâncias impactam de forma negativa o processo fermentativo diminuindo a taxa de crescimento do microrganismo e reduzindo a conversão de etanol (ROSSELL, 2006).

2.4.2. Hidrólise enzimática

Posterior a etapa de pré-tratamento, é realizada a etapa de hidrólise, que pode ser enzimática ou através de ácidos fracos e há uma variedade de mecanismos. A escolha depende de vários fatores, entre eles, a matéria-prima que será utilizada, o microrganismo responsável pela fermentação dos açúcares solúveis e o custo. Entretanto, a literatura tem reportado que a hidrólise por ação de enzimas tem tido melhores resultados e com mais potencial de desenvolvimento, por ser mais prática e não exigir o uso de equipamentos rigorosos e apresentar mais seletividade (LYND et al, 1996).

A hidrólise enzimática depende de vários fatores, entre eles: tipo de substrato, tipo de pré-tratamento utilizado, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e velocidade de agitação (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A hemicelulose e a celulose podem ser hidrolisadas a açúcares e fermentados através de diferentes microrganismos a vários produtos, entre eles o etanol, ou serem degradadas quimicamente em outros produtos. A conversão da hemicelulose através da hidrólise, resulta em pentoses, como arabinose ou xilose. Além disso, a hemicelulose também pode sofrer rupturas em posições intermediárias ao longo de sua cadeia, dando origem a oligômeros compostos de várias moléculas de açúcares, e esses compostos intermediários podem sofrer sucessivos ataques originando oligômeros menores até que surja uma molécula de um simples açúcar. Para agilizar a conversão, o processo pode ser catalisado pela enzima hemicelulase, ou por ácidos diluídos a temperaturas de 100°C até 200°C. (PETRI; OGEDA, 2020). A Tabela 2 apresenta uma comparação entre a hidrólise enzimática e a hidrólise com ácido diluído.

Tabela 3 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática

Variável comparada	Hidrólise enzimática	Hidrólise com ácido diluído
Condições amenas de hidrólise	Sim	Não
Altos rendimentos de hidrólise	Sim	Não
Produção de inibidores durante a hidrólise	Sim	Não
Formação de inibidores como subproduto	Não	Sim
Baixo custo de catalisadores	Não	Sim
Baixo tempo de hidrólise	Não	Sim

Fonte: Adaptado de Taherzadeh (2019).

Tem-se conhecimento do uso de ácido diluído para hidrólise de materiais lignocelulósicos desde 1930, esse processo é conhecido como o processo Scholler ou Madison de percolação. O ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4) isso se deve ao seu baixo preço e poucos problemas com corrosão, quando comparado a ácidos fortes, como o ácido clorídrico (HCl) (PETRI; OGEDA, 2020).

Para hidrolisar cadeias longas de celulose na presença de ácido sulfúrico diluído é necessário condições extremas de temperatura e concentração, tendo em vista que, a maior parte dessa molécula é cristalina e suas cadeias têm grande força de ligação. Uma vez rompida, a celulose origina moléculas de glicose, quem podem ser degradadas a hidroximetil furfural. Em termo de rendimento, conforme a temperatura aumenta, o rendimento aumenta, em torno de 260°C há um rendimento de até 70%. Porém, a geração de subprodutos, como o alcatrão e outros, difíceis de lidar e o difícil controle do tempo de reação necessário para atingir rendimento máximo de glicose, ainda são os principais desafios para o uso desses mecanismos industrialmente (PETRI; OGEDA, 2020).

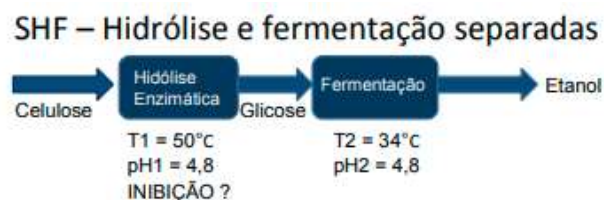
Industrialmente a conversão enzimática da celulose a etanol envolve operações de pré-tratamento para retirar ligninas e expor celulose e hemicelulose ao ataque da celulase. As enzimas celulasas utilizadas para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos podem ser produzidas por bactérias ou fungos, os quais podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Dentre as bactérias produtoras de celulase pode-se citar: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* (RABINOVICH et al, 2002). Entre os microrganismos mais conhecidos para a produção de celulasas e hemicelulasas estão os fungos filamentosos. Enquanto que *Trichoderma* sp. (*T. viride*, *T. reesei*) de linhagens mutantes e selvagens, têm sido consideradas as mais produtivas e têm se destacado por se mostrarem mais

eficientes na hidrólise da porção cristalina da molécula de celulose (RABINOVICH et al, 2002).

Posterior a etapa de pré-tratamento, têm-se as operações de hidrólise e fermentação. Existem dois mecanismos para a realização dessas etapas. Quando a hidrólise ocorre separada e em seguida à fermentação, o mecanismo é conhecido por SHF - *Separate Hydrolysis Fermentation*. Entretanto, nesta operação a glicose e celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e celulase e estes dois compostos (mono e dissacarídeos) são inibitórios da ação da celulase. É possível melhorar os rendimentos ao adicionar grandes quantidades de enzima, mas como esse componente é caro, ele acarreta o aumento do custo do processo (PETRI; OGEDA, 2020).

Visando evitar esta situação, acrescenta-se o microrganismo fermentador ao sistema em que está ocorrendo a hidrólise. Pois, dessa maneira a glicose e a celobiose são rapidamente fermentadas a etanol, reduzindo o contato desses dois compostos inibitórios de celulase. Além disso, os custos são reduzidos e há um aumento na produção de etanol. Além disso, torna a contaminação do mosto por microrganismos indesejáveis mais difícil, por conta da baixa concentração de glicose disponível e a presença de etanol. Esse mecanismo é conhecido como processo de hidrólise e fermentação simultânea, SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Apesar da temperatura do processo SSF ter que ser reduzida abaixo do ótimo, esse mecanismo apresenta melhor desempenho quando comparado ao processo SHF, pois possui maior rendimento e concentração de etanol (PETRI; OGEDA, 2020). A Figura 8 mostra um esquema dos dois diferentes tipos de configurações que podem ser utilizados na hidrólise enzimática.

Figura 8 – Comparação entre SHF e SSF



SSF - Sacarificação e fermentação simultânea



Fonte: Carli (2011).

2.4.3. Fermentação

A fermentação alcoólica é uma reação exotérmica que libera até 24kcal por mol de glicose fermentada, tem uma sequência em que as reações acontecem, e cada reação é catalisada por uma enzima específica. Além disso, é um processo que ocorre na ausência de oxigênio e converte açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico. Este processo é realizado por leveduras, e é essencial para a produção de energia e serão posteriormente utilizadas no seu crescimento, reprodução e realização de suas atividades fisiológicas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Segundo Badotti et al. (2008), é importante que a fermentação seja realizada em anaerobiose, pois quando as leveduras se multiplicam na ausência de oxigênio ou em altas concentrações de açúcar, a fermentação é favorecida, tendo em vista que, o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase. Já na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, o complexo da enzima piruvato desidrogenase favorece a reação para a respiração celular.

Nas indústrias as reações que envolvem reações catalisadas por enzimas ou microrganismos acontecem em biorreatores ou reatores bioquímicos. E tem como principal função garantir um ambiente controlado e livre de contaminações, favorecendo o crescimento saudável das células e uma conversão eficiente do produto desejado. Para Fogler (2012), existem fatores que devem ser considerados no projeto de um biorreator para garantir um bom desempenho da reação bioquímica. Entre eles: matéria-prima e biocatalisador (microrganismo ou enzimas) utilizado, configuração do biocatalisador (livres ou imobilizados), conhecimento do metabolismo e atividades microbianas, quantidade e características do produto e subprodutos a se obter, além do balanço de massa e energia do sistema (FOGLER, 2012).

Pode-se classificar as fermentações industriais de acordo com os tipos de alimentação dos biorreatores, sendo eles contínuos ou descontínuos. O processo de *Melle-Boinot*, que teve origem na França na década de 1930, permitiu um grande avanço na produção de etanol em larga escala, ele consiste na reutilização de parte do conteúdo de uma batelada com alta concentração de microrganismo, em uma batelada subsequente. No Brasil esse processo ficou conhecido como batelada-alimentada (MARTINEZ, 2007).

Nas usinas e destilarias os equipamentos geralmente são de aço e fechados para evitar perda por evaporação e/ou contaminação. Além disso, as dornas de fermentação são do tipo tanque agitado e operam em uma faixa de temperatura entre 33-35°C. Após a fermentação, tem-se a etapa de destilação em que o mosto fermentado será destilado, e haverá a purificação do etanol, obtendo-se etanol hidratado com 97,2% de etanol em volume ou etanol anidro com

99,9% de etanol em volume. A planta de produção possui também um sistema de lavagem do gás de saída com o intuito de recuperar o etanol evaporado que corresponde a 1,5% de todo etanol produzido (PACHECO, 2010; MARTINEZ, 2007).

Nos dois tipos de alimentação existem vantagens e desvantagens. Entre as vantagens da operação em batelada pode-se enumerar, a assepsia do processo e diminuição dos riscos de contaminação de microrganismos indesejáveis, possui certa flexibilidade de operação e possibilidade de utilizar os fermentadores para a fabricação de diversos produtos e melhor condição de controle sobre genética do microrganismo. As desvantagens são os baixos rendimentos e produtividades, pois essa configuração possui uma possibilidade maior de inibição por substrato e produto e o tempo morto das etapas de descarga, lavagem e esterilização (CARVALHO e SATO, 2001).

Estudos apontam que a operação batelada alimentada tem sido eficiente e versátil em muitos processos biotecnológicos, inclusive na produção de etanol, entre as vantagens dessa operação temos a reutilização dos microrganismos da fermentação alcoólica, baixos riscos de contaminação, diminuição da inibição por substrato, aumento da produção devido a presença de um grande número de células viáveis no meio e por consequência um menor tempo de fermentação e menor consumo de nutrientes (BORGES, 2008; CARVALHO e SATO, 2001). Entre as desvantagens: maior possibilidade de mutações genéticas do microrganismo utilizado no processo fermentativo, pouco controle da cinética do processo e dificuldades de assepsia por longo período, além da dificuldade de se estabelecer um estado estacionário, por conta das variações de vazões de alimentações (MELLO, 2001).

Entre as vantagens do sistema contínuo temos, a redução nos custos laboratoriais, pois uma vez que os parâmetros desejados são alcançados há um longo período de produção contínua, maior produtividade em etanol, exige uma infraestrutura menor para a mesma produção e redução dos tempos mortos. Entretanto, esse tipo de processo apresenta pode ser facilmente contaminado (FACCIOTTI, 2001) e investimento inicial ao comparar com outros sistemas citados anteriormente, como o sistema em batelada e *Melle-Boinot*, além disso exigem sistemas de controle mais robustos e é necessário conhecer muito bem o microrganismo utilizado (ATALA et al., 2000).

2.4.4. Microorganismos fermentadores

Em processos fermentativos industriais comumente utiliza-se microrganismos mesofílicos, como bactérias dos ácidos lático e acético, fungos e diferentes cepas de leveduras. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por sua vez, é muito utilizada em processos

fermentativos para produção de álcool combustível (ABDEL-BANAT, 2010). Ela é capaz de fermentar diferentes hexoses, principalmente a glicose, mas também a manose, a frutose e a galactose, em condições de anaerobiose e condições ácidas de pH produzindo gás carbônico e etanol e uma pequena parcela de subprodutos (glicerol, ácidos orgânicos, dentre outros) (WALKER, 1998).

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida e utilizada em diversos processos biotecnológicos, entre eles a panificação e produção de bebidas fermentadas, isso se deve ao fato de ser muito resistente às mudanças das condições do meio e oferecer alta eficiência fermentativa (WALKER, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria prima: Carço de açáí

O carço de açáí foi doado pelo Supermercados Líder na cidade de Marabá-PA e enviado por transportadora para a cidade de Lavras-MG, não foi necessário nenhum cuidado especial no envio. Ao receber a matéria-prima, foi necessário realizar um tratamento antes de submeter o material a hidrólise enzimática. Realizou-se então, o processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado (marca Solab modelo SL-100) por 8h a 105°C. Na sequência, o material foi moído em um moinho de facas (marca Eco Educacional do tipo Willey), visando a diminuição das partículas e aumento da área superficial para facilitar a etapa seguinte de hidrólise enzimática.

3.2. Hidrólise Enzimática

Após secar e moer a biomassa, realizou-se a hidrólise enzimática. Para tal procedimento, foi necessário preparar uma solução de tampão citrato com concentração de 0,05M e pH 4,8, a fim de garantir o pH ótimo da enzima durante a hidrólise. Para 1L de solução foram pesados 7,83g de Citrato de Sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 4,48g de Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).

Feito isso, preparou-se a solução em que de fato aconteceria a hidrólise. Definiu-se o volume reacional de 50mL e avaliou-se a concentração de 10% e 20% de biomassa seca (BS). Para realização dos ensaios de hidrólise enzimática foi utilizado o complexo enzimático comercial Cellic Ctec 2, doado pela Novozymes Latin America – Araucária, PR. Cujas enzimas têm uma atividade de 241 FPU/mL. Para este experimento foi utilizado uma variação de 10 FPU/g_{biomassa} e 20 FPU/g_{biomassa}, e o experimento foi feito em duplicata. As condições analisadas

nesse trabalho foram definidas baseando-se em estudos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Lavras.

Por último foi adicionado o volume de tampão necessário para completar os 50mL de solução, levando em consideração uma umidade de 5,54% da biomassa (base seca) BS, medida em uma balança determinadora de umidade (marca Weblaborsp modelo i-Thermo 163L).

Tabela 4 – Avaliação de diferentes condições operacionais durante a etapa de hidrólise enzimática

Erlenmeyer	Massa de biomassa (base seca) (g)	Volume de enzima (mL)	Volume Sol. Tampão (mL)
10% - 10 FPU (1)	5,293	0,207	49,49
10% - 10 FPU (2)	5,293	0,207	49,49
10% - 20 FPU (1)	5,293	0,414	49,29
10% - 20 FPU (2)	5,293	0,414	49,29
20% - 10 FPU (1)	10,586	0,207	49,20
20% - 10 FPU (2)	10,586	0,207	49,20
20% - 20 FPU (1)	10,586	0,414	48,99
20% - 20 FPU (2)	10,586	0,414	48,99

Fonte: Autor, 2023

A solução foi submetida ao agitador shaker orbital (marca Lucadema modelo LUCA-223) por 48h, a 50°C numa agitação de 150 rpm. As amostras foram colhidas em tempos pré-determinados 1h, 2h, 4h, 6h, 22h, 28h e 46h, para avaliar o desempenho da enzima e a taxa de conversão da celulose em glicose com o tempo. Após a retirada das alíquotas, as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm durante 5 minutos para retiradas de sólidos e o sobrenadante foi armazenado no freezer para posterior quantificação de açúcares. A Figura 9 mostra os frascos erlenmeyers durante a hidrólise enzimática.

Figura 9 – Erlenmeyer com hidrolisado



Fonte: Do autor (2023)

3.3. Fermentação

O inóculo para as fermentações alcoólicas utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 liofilizada, doada pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras. Visando atingir uma população celular de 10^7 células/mL, utilizaram-se 6 g de levedura. A cultura foi reidratada em 60 mL de água destilada estéril, a 38 °C, por 30 minutos. Com o intuito de aumentar a biomassa, a levedura foi transferida para 200 mL de meio YEPG (em g.L⁻¹ ; extrato de levedura, 10,0; peptona de soja, 20,0; glicose, 20,0) e incubada, a 30 °C e 100 rpm, em agitador orbital (marca New Brunswick modelo Excella E25), por 24 horas. Em seguida, a levedura foi centrifugada duas vezes e lavada em água destilada. Após as lavagens, utilizou-se o mosto para ressuspender as células e procedeu-se à inoculação a uma população inicial de 10^7 células.mL⁻¹. Após inoculação mosto foi colocado em agitador orbital (shaker) a 140rpm e 27°C e alíquotas foram retiradas a cada 24h para posterior análise açúcares redutores. Na Figura 10 está representado o mosto.

Figura 10 – Erlenmeyer contendo o mosto



Fonte: Do autor (2023)

3.4. Quantificação de açúcares redutores

Para realizar a quantificação de açúcares, primeiramente foi necessário construir uma curva de calibração para converter os dados de absorbância lidos no espectrofotômetro em concentração. Para isso preparou-se uma solução-mãe de glicose com a concentração de 1g/L e a partir dela foram feitas diluições, essas soluções diluídas foram preparadas para serem lidas no espectrofotômetro à 540 nm seguindo o método DNS para quantificação de açúcares. A partir dos valores de absorbância obtidos foi possível construir uma curva de calibração em que seria possível transformar absorbância em concentração. Todas as leituras de absorbância deste trabalho foram realizadas no espectrofotômetro para multiplacas (marca Bio Tek modelo Epoch).

A Figura 11 mostra as soluções de glicose em diversas concentrações prontas para serem lidas no espectrofotômetro.

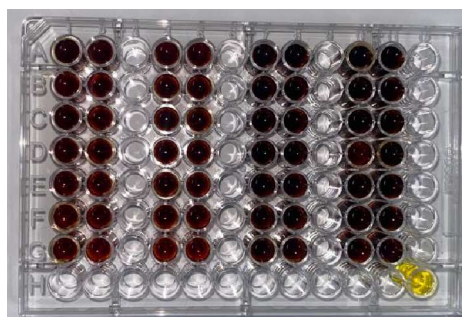
Figura 11 – Tubos de ensaio com variadas concentrações de glicose



Fonte: Do autor (2023)

A **Figura 12** abaixo apresenta a placa utilizada na quantificação de açúcares no espectrofotômetro.

Figura 12 – Placa utilizada leitura no espectrofotômetro



Fonte: Do autor (2023)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Curva de Calibração

Inicialmente foi necessário construir a curva de calibração de glicose. As concentrações e valores de absorbância lidos à 540 nm utilizadas na construção da curva de calibração estão contidos na Tabela 5.

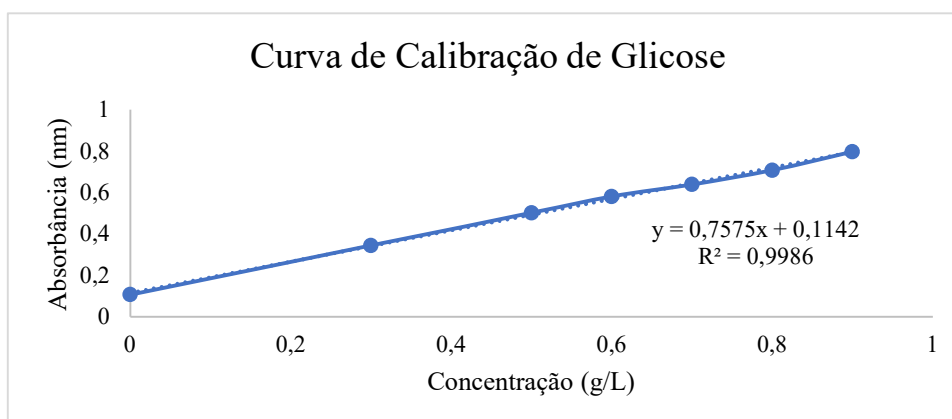
Tabela 5 – Concentração e leituras de absorbância utilizadas na construção da curva de calibração.

Volume Sol. de Glicose (mL)	Volume de Água (mL)	Concentração (g/L)	Absorbância (nm)
0	10	0	0,107
1	9	0,1	0,138
2	8	0,2	0,209
3	7	0,3	0,344
4	6	0,4	0,472
5	5	0,5	0,502
6	4	0,6	0,581
7	3	0,7	0,639
8	2	0,8	0,708
9	1	0,9	0,797
10	0	1,0	0,983

Fonte: Autor, 2023

Para melhor linearização, foram excluídos os pontos de concentração 0,1; 0,2; 0,4 e 1 g/L. A Figura 13 apresenta a curva de calibração e o coeficiente de determinação.

Figura 13 – Curva de calibração de glicose para quantificação de açúcares.



Fonte: Autor, 2023

Ao analisar os dados da Figura 13, pode-se concluir que a linearização foi bastante satisfatória devido ao valor do R^2 ser bem próximo de um. Com a curva de calibração em mãos foram feitas as análises de açúcares redutores.

4.2. Hidrólise enzimática

Foi realizada uma primeira análise de açúcares redutores com o hidrolisado, entretanto quando realizada a leitura, o valor de absorbância foi maior que uma unidade, e tal valor não é representativo. Portanto, para uma leitura efetiva foi necessário diluir a amostra em dez vezes. A Tabela 6 apresenta os valores lidos de absorbância no espectrofotômetro à 540 nm das amostras com 10% de biomassa (base seca).

Tabela 6 – Valores de absorbância à 540nm das amostras com 10% de BS.

Tempo (h)	10% - 10 FPU/g _{biomassa}	10% - 20 FPU/g _{biomassa}
1	0,241 ± 0,009	0,294 ± 0,005
2	0,311 ± 0,005	0,304 ± 0,004
4	0,338 ± 0,005	0,313 ± 0,001
6	0,376 ± 0,013	0,353 ± 0,006
22	0,278 ± 0,011	0,304 ± 0,002
28	0,269 ± 0,001	0,272 ± 0,007
46	0,239 ± 0,006	0,222 ± 0,016

Fonte: Autor, 2023

Ao analisar os valores da Tabela 6, observa-se que os maiores valores de absorbância foram após 6h de reação em ambas as concentrações de enzimas. Além disso, a condição de 10% - 10 FPU/g_{biomassa} apresentou os maiores valor entre as condições analisadas. A Tabela 7 apresenta os valores de absorbância lido nas amostras contendo 20% de biomassa (base seca).

Tabela 7 – Valores de absorbância à 540nm das amostras com 20% de BS.

Tempo (h)	20% - 10 FPU/g _{biomassa}	20% - 20FPU/g _{biomassa}
1	0,720 ± 0,002	0,725 ± 0,003
2	0,947 ± 0,029	0,872 ± 0,025
4	0,867 ± 0,004	0,811 ± 0,046
6	0,812 ± 0,008	0,768 ± 0,011
22	0,713 ± 0,009	0,618 ± 0,047
28	0,625 ± 0,006	0,588 ± 0,039
46	0,492 ± 0,057	0,492 ± 0,007

Fonte: Autor, 2023

Analisando a Tabela 7, observa-se que para a condição de 20% de BS, o pico de absorvância foi com 2h de reação e, novamente, a concentração de 10 FPU/g_{biomassa} apresentou os maiores valores em relação as outras condições analisadas.

Partindo dos valores de absorvância e utilizando a equação da curva de calibração, foi possível encontrar os valores de concentração de glicose em g/L no extrato enzimático. A Tabela 8 apresenta os valores encontrados para as amostras com 10% de biomassa (base seca).

Tabela 8 – Concentração de glicose em g/L no hidrolisado nas amostras com 10% de BS.

Tempo (h)	10% - 10 FPU/g _{biomassa}	10% - 20 FPU/g _{biomassa}
1	1,680 ± 0,125	2,373 ± 0,066
2	2,604 ± 0,073	2,499 ± 0,059
4	2,961 ± 0,073	2,618 ± 0,007
6	3,456 ± 0,172	3,146 ± 0,086
22	2,169 ± 0,152	2,506 ± 0,026
28	2,043 ± 0,013	2,077 ± 0,099
46	1,654 ± 0,086	1,416 ± 0,218

Fonte: Autor, 2023

Ao analisar os dados da Tabela 8, observa-se que a concentração de glicose aumentou durante as primeiras 6h de reação e posteriormente começou a decrescer. E que com essa quantidade de substrato a maior concentração de glicose foi de 3,456 g/L às 6h de reação.

Tabela 9 – Concentração de glicose em g/L no hidrolisado nas amostras com 20% de BS.

Tempo (h)	20% - 10 FPU/g _{biomassa}	20% - 20 FPU/g _{biomassa}
1	7,991 ± 0,033	8,063 ± 0,039
2	10,994 ± 0,383	10,004 ± 0,330
4	9,931 ± 0,059	9,192 ± 0,614
6	9,212 ± 0,106	8,624 ± 0,152
22	7,898 ± 0,125	6,644 ± 0,627
28	6,737 ± 0,086	6,255 ± 0,515
46	4,981 ± 0,759	4,987 ± 0,092

Fonte: Autor, 2023

Ao comparar as condições estudadas, observa-se que as maiores concentrações de glicose aconteceram na condição com 20% de biomassa (base seca). Além disso, o valor

máximo de glicose foi atingido mais rápido nessa mesma condição, o que já era esperado, tendo em vista que a relação substrato/enzima era maior.

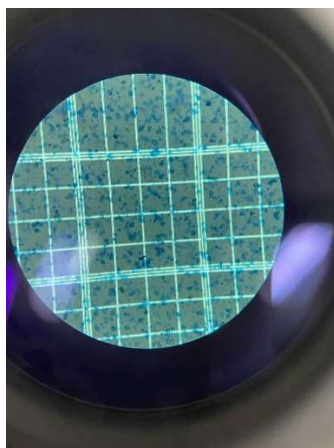
O maior valor foi de 10,994 g/L com 10 FPU/g_{biomassa} às 2h de reação. Ao realizar um cálculo estequiométrico tem-se que 70,31% de celulose foi convertido em glicose, sugerindo, portanto, ser um dado potencial para aplicação futura de novos ensaios de hidrólise enzimática com diferentes cargas de sólidos e enzima.

Ao observar a concentração de glicose com o tempo de reação, fica claro que a conversão não foi constante, e isso já era esperado devido a diminuição da concentração de substrato em relação a enzima. E após atingir o valor máximo de concentração de glicose, as concentrações começaram a diminuir, isso pode ser um indício de que a glicose presente pode ter reagido com outros subprodutos, dando origem a um novo subproduto ou pode ter acontecido a degradação dos açúcares formados.

4.3. Fermentação Alcoólica

Na sequência, o hidrolisado foi submetido à fermentação alcoólica. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, a primeira amostra foi colhida assim que o extrato foi inoculado. A segunda alíquota, foi coletada 24h depois do início da fermentação. Logo que a amostra foi retirada realizou-se uma contagem de leveduras vivas através do método da câmara de Neubauer, e o resultado foi satisfatório, portanto, manteve-se a fermentação. A terceira amostra foi coletada 48h após o início da fermentação e novamente realizou-se a contagem. Entretanto, dessa vez não havia mais microrganismos vivos, encerrando assim o processo fermentativo. A Figura 14 representa a alíquota lida no microscópio após 48h de fermentação.

Figura 14 – Contagem de leveduras vivas no microscópio após 48h de reação



A Tabela 10 apresenta os valores de absorvância lidos à 540nm.

Tabela 10 – Valores de absorvância do fermentado lido à 540nm.

Condição	Tempo (h)		
	0	24	48
10% - 10 FPU/g _{biomassa}	0,239 ± 0,006	0,159 ± 0,029	0,107 ± 0,007
10% - 20 FPU/g _{biomassa}	0,244 ± 0,007	0,208 ± 0,001	0,143 ± 0,009
20% - 10 FPU/g _{biomassa}	0,543 ± 0,006	0,278 ± 0,006	0,201 ± 0,011
20% - 20 FPU/g _{biomassa}	0,492 ± 0,007	0,364 ± 0,005	0,240 ± 0,006

Fonte: Autor, 2023

Após o processo fermentativo, obteve-se um valor de absorvância bem mais baixo, indicando uma menor concentração de glicose. O que já era esperado, tendo em vista que, no processo fermentativo, os microrganismos iriam consumir a glicose presente para liberar etanol. A Tabela 11 apresenta a concentração de glicose após a fermentação.

Tabela 11 – Concentração de glicose em g/L no fermentado.

Condição	Tempo (h)		
	0	24	48
10% - 10 FPU/g _{biomassa}	1,654 ± 0,086	0,598 ± 0,376	0,000 ± 0,000
10% - 20 FPU/g _{biomassa}	1,720 ± 0,086	1,238 ± 0,013	0,387 ± 0,112
20% - 10 FPU/g _{biomassa}	5,661 ± 0,079	2,156 ± 0,073	1,139 ± 0,139
20% - 20 FPU/g _{biomassa}	4,987 ± 0,092	3,304 ± 0,073	1,667 ± 0,086

Fonte: Autor, 2023

Ao analisar a tabela acima, observa-se que na condição 10% - 10 FPU/g_{biomassa} toda a glicose presente foi consumida pelos microrganismos, chegando ao final do processo fermentativo sem nenhuma concentração de açúcar fermentescível, indicando um consumo de 100% de açúcar. As condições com 20% de biomassa (base seca) chegaram ao final da etapa com uma concentração de glicose reduzida, e ao comparar com a concentração inicial do processo, houve um consumo médio de 73%, sendo os maiores consumos na condição 20% e 10 FPU/g_{biomassa}.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, observou-se que o caroço de açaí se mostrou ser uma biomassa lignocelulósica que possui potencial energético para produção de bioetanol, uma vez que possui um alto teor de celulose (40,29%) e obteve um rendimento satisfatório na etapa de hidrólise enzimática, alcançando uma concentração de glicose de até 10,994 g/L.

Além disso, a quantidade de glicose presente se mostrou bem assimilada pela levedura utilizada nesse estudo, uma vez que a concentração de glicose diminuiu, chegando até zerar em alguns casos, ao final do processo fermentativo.

Por fim, analisando as condições estudadas, a condição com 20% de biomassa (base seca) e 10FPU/g_{biomassa} foi a que melhor respondeu tanto na hidrólise enzimática, liberando mais açúcar, quanto na fermentação, com maior consumo de glicose. Sendo um resultado satisfatório, tendo em vista, os melhores resultados se encontram nas condições com menor quantidade de enzima, componente que encarece a reação.

REFERÊNCIAS

- Araujo, Gerado & Navarro, Luiz & Santos, Bruno. (2013). "O Etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo". *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*. 9. <https://doi.org/10.17271/19800827952013492>.
- Ceretta, P. S., Sari, J. F., & Ceretta, F. C. da C. (2020). "Relação entre Emissões de CO₂, Crescimento Econômico e Energia Renovável". *Desenvolvimento Em Questão*, 18(50), 268–286. Web.
- Cordeiro, Marcio De Andrade, Ossalin De Almeida, Douglas Alberto Rocha De Castro, Haroldo Jorge Da Silva Ribeiro, and Nélio Teixeira Machado. "HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe Oleracea Mart*) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL." *Revista Brasileira De Energias Renováveis* 8.1 (2019): *Revista Brasileira De Energias Renováveis*, 2019, Vol.8 (1). Web.
- De Figueiredo, Rafael, João Inácio Soletti, Sheyla Welma Duarte Da Silva, Jumelice Dos Santos Silva, Kelyane Da Silva, Pierre Barnabé Escodro, Denise Macêdo Da Silva, Karol Fireman De Farias, and Tatiane Luciano Balliano. "MAPEAMENTO PROSPECTIVO DAS TECNOLOGIAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL." *Cadernos De Prospecção* 11.1 (2018): 127. Web.
- Faizal, A., Sembada, A.A., Priharto, N., 2021. Production of bioethanol from four species of duckweeds (*Landoltia punctata*, *Lemna aquinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza*, and *Wolffia arrhiza*) through optimization of saccharification process and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.002>.
- Jugwanth, Y., Sewsynker-Sukai, Y., Gueguim Kana, E.B., 2020. Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel* 262, 116552. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>.
- Leite, R. C. C., Leal M. R. L.V., 2007. O Biocombustível no Brasil. *Novos Estudos CEBRAP*, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-33002007000200003>.
- Lindomayara França Ferreira, José Ricardo De Santana, Márcia Siqueira Rapini, and Fábio Rodrigues De Moura. "Financiamento à Pesquisa Em Energia Renovável No Brasil: Uma Análise a Partir Do Fundo Setorial De Energia." *Nova Economia (Belo Horizonte, Brazil)* 32.2 (2022): 505. Web. <https://doi.org/10.1590/0103-6351/6984>.
- Liu, C., Wang, C., Yao, H., Chapman, S.J., 2021. Pretreatment is an important method for increasing the conversion efficiency of rice straw by black soldier fly larvae based on the function of gut microorganisms. *Sci. Total Environ.* 762, 144118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144118>.

Manmai, N., Unpaprom, Y., Ponnusamy, V.K., Ramaraj, R., 2020. Bioethanol production from the comparison between optimization of sorghum stalk and sugarcane leaf for sugar production by chemical pretreatment and enzymatic degradation. *Fuel* 278, 118262. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118262>.

Ribeiro M. N. "Bioetanol." *Sustentabilidade Em Debate* 3.1 (2012): Sustentabilidade Em Debate, 2012, Vol.3 (1). Web.

Ogeda, T.L., & Petri, D.F., 2010. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, 33, 1549-1558. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>.

Rodríguez-Zúñiga, U. F.; Lemo, V.; Farinas, C. S.; Bertucci Neto; Couri, S., 2008. 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.

Santos, G. H F., Nascimento, R. S., Alves, G. M., 2016. "Biomassa Como Energia Renovável No Brasil." *UNINGÁ Review* 29.2 (2017): 06-13. Web.

Souza, A. C., 2011. Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração. Web.

Julich, J., Gassen, M., Werlang, E. B., Muller, M. V. G.; Silva, G. de A., Nevez, F. de F., Schneider, R. C. S., 2019. "Estudo da hidrólise enzimática de biomassa de microalga empregando uma sequência de enzimas. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, v.8, n. 2, p. 77-84, jul./dez. 2019. <https://doi.org/10.17058/rjp.v9i2.13519>.