



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROFISSIONAL EM ENERGIA DA  
BIOMASSA



CECA

ANA MARIA SOUZA DOS SANTOS PAU FERRO

**ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO FRUTO DA *Terminalia catappa*  
*Linn* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Rio Largo – 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROFISSIONAL EM ENERGIA DA  
BIOMASSA



ANA MARIA SOUZA DOS SANTOS PAU FERRO

**ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO FRUTO DA *Terminalia catappa*  
*Linn* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Energia da Biomassa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Maria Rosas Garcia Almeida  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Allani Christine Monteiro Alves da Rocha

Rio Largo – 2016

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

F395e      Ferro, Ana Maria Souza dos Santos Pau.  
              Estudo de pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa* Linn para  
              produção de etanol de segunda geração/ Ana Maria Souza dos Santos Pau  
              Ferro. – 2016.  
              49 f. : il.

              Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.  
              Coorientadora: Allani Christine Monteiro Alves da Rocha.  
              Dissertação (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) – Universidade  
              Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação em Energia da Biomassa. Centro  
              de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

              Bibliografia: f. 44-53.

              1. Pré-tratamento ácido. 2. Etanol de segunda geração. 3. *Terminalia catappa*  
              Linn. 4. Fermentação etanólica. I. Título.

CDU: 661.725:634.55

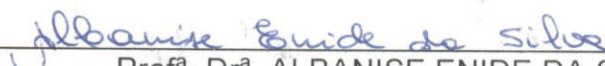
ANA MARIA SOUZA DOS SANTOS PAU FERRO

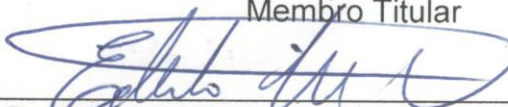
**ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO FRUTO DA *Terminalia catappa*  
Linn PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação de Mestrado defendida em 03 de junho de 2016 e julgada pela comissão examinadora, para obtenção do título de Mestra em Energia da Biomassa.


BANCA EXAMINADORA:

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA  
Presidente

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. ALBANISE ENIDE DA SILVA  
Membro Titular

  
Prof. Dr. EDUARDO LUCENA CAVALCENTE DE AMORIM

Membro Titular

  
Prof. Dr. CICERO LUIZ CALAZANS DE LIMA  
Membro Titular

  
MARCOS ANTÔNIO LOPES  
Secretário

Dedico este trabalho aos meus filhos  
Thiago Souza dos Santos e Luana Tássia Souza  
dos Santos, bem como a meu Tio José Pau Ferro  
e minha Sogra Genilda Correia da Silva.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente as três pessoas mais importantes da minha vida: Pai, Filho e Espírito Santo, por realizar em Seu tempo este sonho. Aos meus pais Manoel Eufrazio de Souza (*in memoriam*) e minha mãe Afra da Silva Souza, aos meus filhos amados Thiago Souza dos Santos e Luana Tássia Souza dos Santos, ao tio José Pau Ferro, à Gilda, e a todas as irmãs e cunhadas, pela força, carinho e atenção durante toda jornada.

Aos Programas de Pós-Graduação em Energia da Biomassa (CECA) e Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), aos meus colegas de sala, aos mestres, que me ajudaram a alcançar os meus objetivos e a concretizar esta etapa em minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Maria Rosas Garcia Almeida, à minha Co-orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Allani Christine Monteiro Alves da Rocha, aos mestres e amigos Alessandro Omena, Tânia Voronkoff e Leone Leite, pela confiança que me foi depositada, pela força, incentivo, motivação e apoio.

A todos que me prestaram auxílio nos laboratórios de Sistemas de Separação e Otimização dos Processos (LASSOP) e Laboratório Tecnológico de Bebidas e Alimentos (LTBA) pelo dinamismo e acolhida.

À técnica e amiga Margarete Cabral pelos momentos ímpares de aprendizado e companheirismo.

Ao Senhor Marcos da Secretaria do CECA por todo o carinho e respeito.

A todo o corpo docente do CESMAC, em especial ao Campus II, e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este momento.

## RESUMO

Devido à crise do petróleo, a indústria de etanol desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos para lidar com o esgotamento dos combustíveis fósseis e o etanol a partir de matérias-primas renováveis (bioetanol) têm sido de grande interesse nas últimas décadas como um combustível alternativo. Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar o pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa Linn* para produção de etanol de segunda geração. Na metodologia utilizada as variáveis de interesse estudadas foram a concentração de ácido sulfúrico (2,5% e 5%), a concentração de biomassa (5g de resíduo/100 mL de solução ácida) e tempo de aquecimento (15 min a 30 min), em temperaturas variando de 111° C a 120° C, organizando-se num planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com três repetições de amostras. Na fermentação etanólica, empregou-se a amostra pré-tratada, solução mineral e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como principais respostas a concentração de etanol e a eficiência da fermentação. A maior eficiência fermentativa se deu para o ensaio que possui maior concentração de ácido (5,0%), tempo (30min) e temperatura (120°C), assim como se obteve, também, a maior quantidade de etanol. O teor de etanol produzido foi de 14,27 g/L e a eficiência fermentativa de 59%. A produção de etanol teve valores compatíveis com a literatura, sendo assim, este pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa Linn* para produção de etanol de segunda geração, na faixa estudada, mostra ser promissor.

Palavras chaves: pré-tratamento ácido. Etanol de segunda geração. *Terminalia catappa Linn*. Fermentação etanólica.

## ABSTRACT

Due to the oil crisis, the ethanol industry has developed rapidly in recent years to deal with the depletion of fossil fuels. Ethanol from renewable raw materials (bioethanol) has been of great interest in recent decades as an alternative fuel. There, this paper aims to study the acid pretreatment of *Terminalia catappa* Linn fruit for a second generation ethanol. The methodology of the studied variables of interest were the concentration of sulfuric acid (2.5% and 5%), the concentration of biomass (waste 5g / 100 ml of acid solution) and heating time (15 min to 30 min) at temperatures ranging from 111° C to 120° C, organized in a 2<sup>3</sup> factorial design with three replications samples. In the ethanolic fermentation, the pretreatment sample solution and the mineral *Saccharomyces cerevisiae* yeast were utilized having ethanol concentration and fermentation efficiency as main responses. The increased fermentation efficiency was given for the test that had the highest acid concentration (5.0%), time (30 minutes) and temperature (120 ° C) as well as the the highest amount of ethanol. The produced ethanol content was 14, 27 g / L and had a fermentation efficiency of 59%. The Ethanol production has compatible values with the ones found in the literature, so, the study group of this acid pretreatment of the fruit of *Terminalia catappa* Linn, for a second generation ethanol production proved to be promising.

Key words: Pretreatment. Second generation ethanol. *Terminalia catappa* Linn. Ethanol fermentation.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Terminalia catappa</i> Linn.....	14
<b>Figura 2</b> – Frutos inteiros <i>Terminalia catappa</i> Linn.....	15
<b>Figura 3</b> – Distribuição da matriz energética nacional e mundial.....	19
<b>Figura 4</b> – Estrutura da celulose.....	21
<b>Figura 5</b> – Estrutura da hemicelulose.....	22
<b>Figura 6</b> – Estrutura da lignina.....	23
<b>Figura 7</b> – Esquema da desorganização da biomassa celulósica.....	25
<b>Figura 8</b> – Diagrama das etapas do estudo pre-tratamento ácido do fruto da terminalia catappa linn para produção de etanol de segunda geração....	27
<b>Figura 9</b> – Polpa das amêndoas.....	28
<b>Figura 10</b> – Amêndoas liquidificadas.....	29
<b>Figura 11</b> – Curva de calibração do dicromato de potássio.....	36
<b>Figura 12</b> – Cromatograma da caracterização da constituição química da amêndo por HPLC.....	39
<b>Figura 13</b> – Cromatograma dos padrões analíticos para HPLC.....	40
<b>Figura 14</b> – Gráfico de Pareto para o pré-tratamento ácido.....	42

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1</b> – Principais etapas para a produção de etanol por biomassa lignocelulósica.....	20
<b>Quadro 2</b> - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção do bioetanol.....	21
<b>Quadro 3</b> – Planejamento Experimental Fatorial $2^3$ .....	34
<b>Quadro 4</b> – Dados das propriedades do fruto da <i>Terminalia catappa</i> Linn, resíduo da Graviola, casca do Maracujá, bagaço da Laranja e bagaço da Cana-de-açúcar.....	37
<b>Quadro 5</b> – Matriz de planejamento fatorial $2^3$ .....	41
<b>Quadro 6</b> – Resultados dos Açúcares Redutores Totais, Teores Alcolólicas, Rendimentos das Fermentações e Eficiência das Fermentações para os ensaios após a etapa de fermentação.....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Terminalia catappa Linn</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Bioetanol</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Biomassa</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Materiais Lignocelulósicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Pré-tratamento</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Fermentação</b> .....	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta e processamento da amêndoa</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterizações da amêndoa</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudo do pré-tratamento ácido</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Fermentação etanólica</b> .....	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Destilação</b> .....	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Propriedades da amêndoa</b> .....	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Estudo das condições de pré-tratamento ácido da matéria-prima</b> .....	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Fermentação etanólica</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO</b> .....	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As questões envolvendo o meio ambiente bem como o crescente aumento dos custos do petróleo, ligado à produção de energia tem sido motivo para constantes buscas de combustíveis alternativos. Sendo assim, o etanol aparece como uma grande opção para se fazer esta substituição.

Desde a primeira crise mundial do petróleo, em 1973, observa-se a existência de políticas públicas em diversos países destinadas a promover a produção de biocombustíveis de forma mais consistente. No caso brasileiro, a política de criação do Pró-Álcool visou reduzir a dependência do país dos combustíveis fósseis, ao mesmo tempo em que se buscou construir uma alternativa à matriz energética do país. (PNPB, 2010).

Devido a essa crise do petróleo, a indústria de etanol desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos para lidar com o esgotamento dos combustíveis fósseis e o etanol a partir de matérias-primas renováveis (bioetanol) têm sido de grande interesse nas últimas décadas como um combustível alternativo por apresentar balanços energéticos positivos e adequadamente atender critérios de sustentabilidade ambiental. (PASSOS *et al.*, 2015).

Atualmente a biomassa lignocelulósica, como madeira e resíduos agroindustriais, encontrada, por exemplo, nas palhas de arroz e polpas de frutos como acerola, laranja, maracujá e o bagaço da cana, sendo este último, um dos mais importantes, dentre outras, têm potencial para serem matérias-primas para a produção do bioetanol devido ao seu grande potencial como fonte de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose) para a fermentação etanólica e outros produtos químicos (MANDALOUFAS *et al.*, 2015; PASSOS *et al.* 2015).

O fruto da castanhola (*Terminalia catappa Linn*) é carnoso, indeiscente, drupáceo, glabo, de coloração verde a vinácea quando maduro (BARROSO *et al.*, 1999). Possui cerca de 5 a 7 cm, apresenta-se constituído por uma pele externa (exocarpo), polpa (mesocarpo) e em seu interior por um caroço rígido (endocarpo), contendo uma semente oleaginosa, que é revestida por uma película (VARESCHI, 1979 citado por GONZÁLEZ-MENDOZA *et al.*, 2005). Quantidades significativas de frutos são produzidas de 3 a 5 anos após a plantação, com frutificações

regulares de duas a três vezes ao ano (THOMSON e EVANS, 2006). Trata-se de uma fruta que apesar de possuir sabor agradável e quantidades representativas de nutrientes, é pouco utilizada na alimentação humana, sendo a árvore muito utilizada para ornamentação de praças e demais espaços urbanos, pela beleza de suas copas e pelas sombras que proporcionam (DE PAULA, 2008).

Assim, dentro desse contexto, este trabalho tem forte interesse científico, envolvendo estudos e pesquisas que busquem a produção de etanol através do fruto da *Terminalia catappa* Linn, tendo grande relevância social e regional, fornecendo, ainda, uma alternativa para utilização destes frutos nas indústrias emergentes de biocombustíveis.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral

Estudar o pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa* Linn para produção de etanol de segunda geração (E2G).

### 2.2 Específicos

Para alcançar o objetivo geral proposto, os seguintes objetivos específicos foram definidos para relacionar a influência dos parâmetros estudados com a viabilidade técnica:

- Caracterizar através de análises físico-química a polpa do fruto da *Terminalia catappa* Linn ;
- Avaliar a resposta de pré-tratamento ácido por meio da libertação de açúcares redutores totais;
- Avaliar a fermentabilidade da fração líquida da biomassa pré-tratada em razão do teor alcóolico produzido.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Terminalia catappa* Linn

A árvore da castanhola (*Terminalia catappa* Linn) pertence à família *Combretaceae*, desenvolve-se em regiões tropicais e subtropicais, é conhecida popularmente no Brasil como castanhola, amêndoa da praia, castanheira, amendoeira, guarda-chuva, noz-da-praia, chapéu-de-sol e sete-copas, dentre outras denominações (GILMAN e WATSON, 1994; LORENZI *et al.*, 2003; THOMSON e EVANS, 2006).

Segundo (CAVALCANTE *et al.*, 1986) teve sua origem na Ásia meridional. É uma grande árvore, espalhando-se e distribuindo-se ao longo dos trópicos no ambiente litoral. A árvore cresce principalmente em ambientes livres e drenados, e em solos bem arejados e arenosos (SANTOS *et al.*, 2008). É encontrada principalmente na parte sul da Nigéria, especialmente no Sudeste, onde são plantadas principalmente para prestação de sombra e para fins ornamentais (EZEOKONKWO e DODSON, 2004).

Trata-se de uma espécie exótica adaptada as várias condições de clima do Brasil, resistente ao calor, frio, escassez de água, ventos fortes e salinidade (SILVA *et al.*, 2010).

A árvore (Figura 1) *Terminalia catappa* Linn, pode atingir até 20 metros, possui copa muito característica em formato de pirâmide, no entanto seus ramos secundários ficam distribuídos horizontalmente em verticilos ao longo do tronco principal, dando a impressão de faixas bem definidas.

**Figura 1** – *Terminalia catappa* Linn.



**Fonte:** Autora, 2016.

O tronco é curto e canelado, com casca áspera de cor acinzentada. Apresenta folhas coriáceas, simples, com nervuras bem visíveis, de 20-30 cm de comprimento, concentradas na extremidade dos ramos e que adquirem coloração amarelada ou avermelhada antes de caírem. Suas flores são pouco vistosas de cor branco-esverdeada, dispostas em inflorescências unissexuais, porém ambos os sexos são localizados no mesmo ramo. Os frutos (Figura 2) são drupas, com polpa carnosa, contendo em seu interior uma semente (castanha) arredondada e rica em gordura, (TEIXEIRA, 2010).

Segundo os dicionários Michaelis (2000) e Ferreira *et al.* (1993), o termo amêndoa pode ser dado aos frutos provenientes de muitas árvores que produzem sementes oleaginosas, incluindo a espécie *Terminalia catappa* Linn.

A amêndoa são frutos da castanhola que são nutritivos e utilizados na alimentação humana, assim como de animais e pássaros. Por se alimentarem dos frutos e, às vezes, das sementes, esses animais facilitam a dispersão natural (FLORES, 2003; THOMSON e EVANS, 2006).

**Figura 2** – Frutos inteiros *Terminalia catappa* Linn.



**Fonte:** AUTORA, 2016.

Segundo De Paula (2008), em pesquisa realizada no sudoeste da Bahia acerca de frutos da *Terminalia catappa* Linn, observou que o extrato etanólico da polpa apresenta um bom potencial antioxidante, apresentando uma porcentagem similar ao antioxidante sintético Butilhidroxianisol (BHA), porém a uma concentração 10 vezes maior. Esta grande diferença é aceitável, uma vez que se trata de um extrato natural.



Por ser uma espécie rústica e de rápido crescimento, é amplamente utilizada para fins ornamentais (FRANCIS, 1989), medicinais (THOMSON e EVANS, 2006), produção de madeira, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, arborização urbana e rural (ANGEL *et al.*, 2003; MENESES *et al.*, 2003).

Como é uma planta de características tão peculiares e tão adaptável ao nosso nordeste brasileiro, tem-se interesse em seu estudo testando seu potencial energético a exemplo da cana-de-açúcar, da beterraba e outras frutas como a laranja, a acerola, o maracujá e tantas outras na obtenção de bioetanol de segunda geração.

### **3.2 Bioetanol**

O bioetanol é um combustível que pode ser produzido mediante qualquer biomassa que contenha quantidades expressivas de açúcares, amido ou celulose (SILVA, 2009).

No entanto, essa opção oferece limitado potencial de redução de custos de produção e sua viabilidade é passível de continuar dependendo de incentivos externos, como subsídios agrícolas. Além disso, adesão às especificações do combustível e efetivo controle de qualidade são fatores importantes para garantir a viabilidade comercial.

Assim sendo, desde a Revolução Industrial no século XVIII, os combustíveis fósseis se tornaram os recursos energéticos mais importantes. No entanto, o consumo em massa desses combustíveis tem causado sérios problemas ambientais, como a poluição do ar, deterioração atmosférica, efeito estufa e o aquecimento global. Para diminuir esses problemas, o desenvolvimento de energia renovável recebeu uma grande atenção ao longo das décadas. A energia da biomassa ou bioenergia é atualmente a quarta maior fonte de energia primária no mundo, sendo assim, um potencial substituto para combustíveis fósseis (WU *et al.*, 2012).

Os chamados biocombustíveis de primeira geração são aqueles obtidos das culturas dedicadas, usualmente estas culturas são utilizadas na alimentação

humana e animal. Nos Estados Unidos a principal cultura dedicada é o milho, já no Brasil nós temos a cana-de-açúcar (GHATAK, 2011; HOEKMAN, 2009).

De acordo com Halford (2010) nestas culturas os açúcares podem estar livres ou parcialmente livres, como por exemplo, nas fontes sacarinas, como é o caso da cana-de-açúcar e da beterraba sacarina; podem estar também na forma de amido (polímero de glicose que as plantas sintetizam para armazenar energia), como nas fontes amiláceas, dentre estas podemos citar o milho, a mandioca e a batata.

Conforme cita Wosch (2010), a produção de bioetanol mundial em 2001 era de 31 bilhões de litros. A demanda de etanol no país crescerá 150% nos próximos dez anos, evoluindo de 25,5 bilhões de litros em 2008 para 63,9 bilhões de litros em 2017. O aumento do consumo será sustentado fundamentalmente pela utilização no setor automotivo (EPE, 2008).

O etanol de segunda geração nada mais é do que o combustível produzido a partir de materiais lignocelulósicos, utilizando como matérias-primas biomassas, como os resíduos agroindustriais a exemplo da palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, palha e sabugo do milho, além de resíduos florestais, como pó de serra (CABRAL, 2015).

De acordo com Oliveira e Pimenta (2010), o etanol a partir da celulose é um dos processos de fabricação adotado em alguns países nórdicos e atualmente tem ganhado força no Brasil, com o incentivo de produção a partir do bagaço da cana de açúcar, conhecido como etanol de segunda geração, porém é um processo mais complexo quando comparado à fermentação trivial. Os custos de produção de biomassa no Brasil são os menores do mundo, isso ressalta a possibilidade de resultados satisfatórios. Além disso, a perspectiva é de que a produção de etanol lignocelulósico aumente em até 50% a produção de álcool e, o mais interessante, sem necessitar expandir o plantio (SILVA, 2012).

Sendo assim, faz-se necessários maiores estudos sobre esta biomassa que se encontra com facilidade em nossa região para a produção de bioetanol, e que não há na literatura maiores informações.

### **3.3 Biomassa**

Biomassa é qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de energia acumulada em sua constituição química e que pode ser processada para fornecer energia adequada para o uso final (SILVA, 2014).

Segundo Torresi *et al.* (2010), o Brasil é o país com maior condição de gerar biomassas renováveis, devido a diversos aspectos ambientais, mas que deve estar alerta para o início desta revolução que, se for corretamente conduzida, poderá nos levar a uma nova era em termos de saúde pública, riqueza e prosperidade, através da exploração racional, sustentável e ambientalmente aceitável dos nossos recursos naturais. No entanto, devemos fazê-lo corretamente e aprender com os erros de um século de crescimento que usou a tecnologia, mas se baseou em avaliações incompletas e míopes para alimentar uma sociedade mais impulsionada pela ganância e o consumismo que pela necessidade.

Quando as plantas crescem, sua totalidade do carbono na biomassa vem da atmosfera, e é liberado para o ambiente. Por conta de ter uma pegada de carbono líquido zero a biomassa é considerada como um combustível neutro em carbono (NAIK *et al.*, 2010).

Segundo Goldemberg (2009) existe um grande número de tecnologias de conversão energética da biomassa, adequadas para aplicações em pequenas e grandes escalas. Elas incluem gaseificação, métodos de produção de calor e eletricidade (cogeração), recuperação de energia de resíduos sólidos urbanos e gás de aterros sanitários além dos biocombustíveis para o setor de transportes (etanol e biodiesel).

O recente interesse na energia da biomassa tem dado ênfase em aplicações que produzem combustíveis líquidos para o setor de transportes (Biocombustíveis). Dadas as crescentes preocupações quanto ao futuro da oferta global de petróleo e a de outras opções de combustíveis disponíveis para o setor de transportes, tais combustíveis representam a melhor das opções de uso da energia de biomassa.

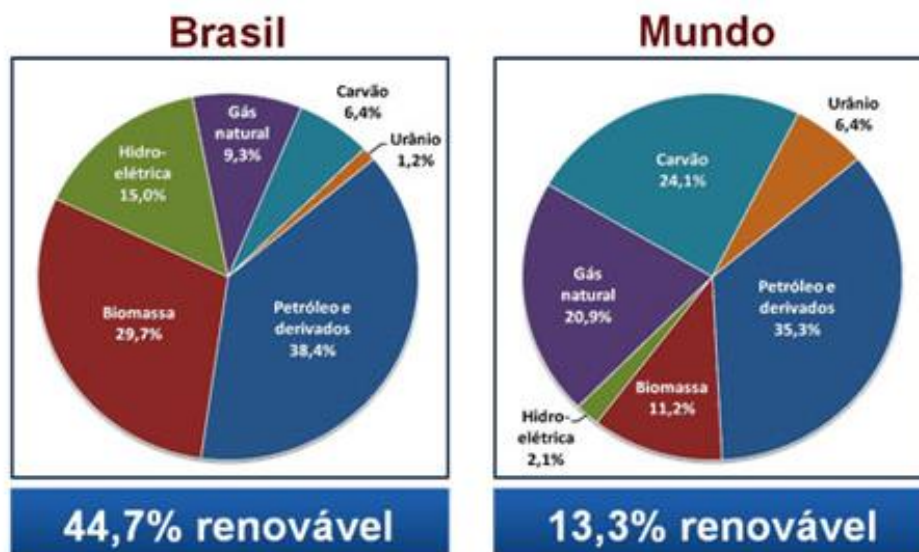
A biomassa proveniente de resíduos agroindustriais pode apresentar como vantagens seu reaproveitamento, resolver o problema de descarte e oferecer um baixo custo de produção (SILVA, 2014).

A energia da biomassa pode desempenhar um papel importante na redução das emissões de gases com efeito de estufa; desde CO<sub>2</sub> que surge a partir de resíduos de biomassa e que originalmente foram absorvidos a partir do ar, a utilização da biomassa para energia tem compensações de emissões de gases com efeito de estufa dos combustíveis fósseis (LYND, 1996).

Diante das diversas fontes energéticas renováveis que estão em crescente desenvolvimento e participação no mercado internacional, em especial, com potencial a curto e médio prazos, para suprir a demanda ineficiente do petróleo, encontra-se a bioenergia, fruto da biomassa, que resulta na produção de bicomcombustíveis (etanol e biodiesel), carvão vegetal, biogás e outros.

A Figura 3 apresenta a distribuição da matriz energética nacional e mundial, tendo um consumo de 44,7 % de energia renovável e 13,3% para energias renováveis, respectivamente (MME, 2015).

**Figura 3** – Distribuição da matriz energética nacional e mundial.



Fonte: MME, 2015.

Ainda segundo Goldemberg (2009), o balanço energético para a produção de etanol a partir de vários produtos agrícolas, já é uma realidade. Globalmente,

existem oportunidades para expandir a produção de etanol da cana-de-açúcar: quase 100 países produzem cana-de-açúcar e as tecnologias de conversão são disponíveis. Além disso, a experiência brasileira sugere que os impactos ambientais adversos associados com a produção em larga-escala de etanol da cana-de-açúcar podem ser significativamente mitigados.

A biomassa lignocelulósica inclui quatro etapas principais para a produção de etanol, conforme o Quadro 1.

**Quadro 1** – Principais etapas para a produção de etanol por biomassa lignocelulósica.

1	Pré-tratamento	Quebra a estrutura da matriz lignocelulósica.
2	Enzimática de celulose	Despolimeriza a hidrólise de glicose por meio de enzimas celulolíticas.
3	Fermentações	Metabolizam a glicose em etanol, geralmente por microrganismos, bactérias ou a estirpe de levedura.
4	Destilação	Separando e purificando o etanol para atender às especificações dos combustíveis.

**Fonte:** GOLDEMBERG, 2009.

### **3.4 Materiais Lignocelulósicos**

Lignocelulose é o material renovável mais abundante na terra (HOEGGER, 2013). O potencial do material de lignocelulose é enorme e tem sido utilizado pelos seres humanos há milhares de anos. Com o progresso da moderna ciência dos materiais, a lignocelulose pode também ser usado como matéria-prima para os biocombustíveis, uma variedade de produtos químicos da especialidade e objetos funcionalmente versáteis (STÖCKER, 2008; THAKUR *et al.*, 2015). No Quadro 2, pode-se observar a composição de alguns tipos de biomassas lignocelulósicas:

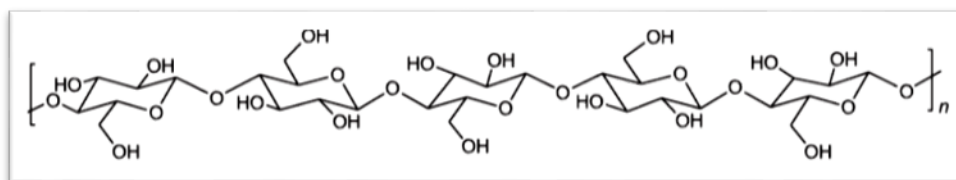
**Quadro 2** - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção do bioetanol.

<b>Biomassa Lignocelulósica</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Outros (%)</b>
<b>Palha de cana</b>	39,8	28,6	22,5	8,6
<b>Bagaço de cana</b>	42,8	25,9	22,1	7,5
<b>Palha de milho</b>	54,4	16,2	23,8	8,0
<b>Sabugo de milho</b>	41,0	36,0	6,0	14,0
<b>Palha de trigo</b>	30,0	24,0	18,0	10,0
<b>Palha de arroz</b>	43,5	22,0	17,2	11,4

Fonte: SANTOS *et al.*, (2014).

A celulose é considerada o polímero natural de maior ocorrência no mundo e encontra-se na estrutura básica das células de todas as plantas respondendo por cerca de 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. (SANTOS, 2014). É um polímero que apresenta regiões altamente ordenadas e sua unidade repetitiva é a celobiose, sendo considerado como um homopolissacarídeo (Figura 4). É constituída de unidade de  $\beta$ Dglicopiranosose que se ligam entre si por ligações covalentes, através dos carbonos 1-4, formando o homopolímero de anidroglicose, que apresenta fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . (SANTOS *et al.*, 2012).

**Figura 4** – Estrutura da celulose.

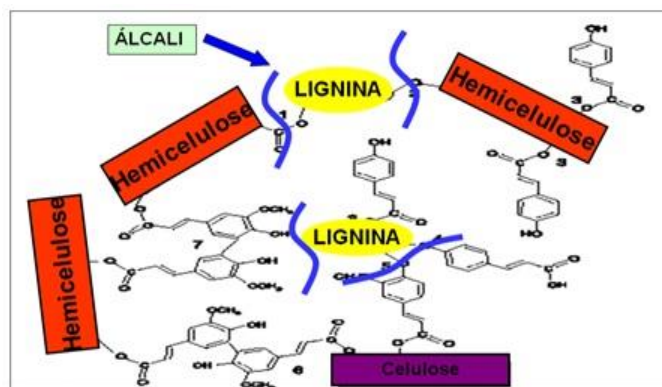


Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

As hemiceluloses ou polioses são heteropolissacarídeos complexos que apresentam cadeias menores que as das celuloses. São compostas por D-

glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. Em relação à estrutura, são mais semelhantes às celulosas do que a lignina. As hemiceluloses (Figura 5) são ramificadas e mais suscetíveis à hidrólise ácida, quando comparadas às celulosas, uma vez que oferecem maior acesso aos ácidos minerais normalmente usados para catalisar essas reações (CANILHA *et al.*, 2010).

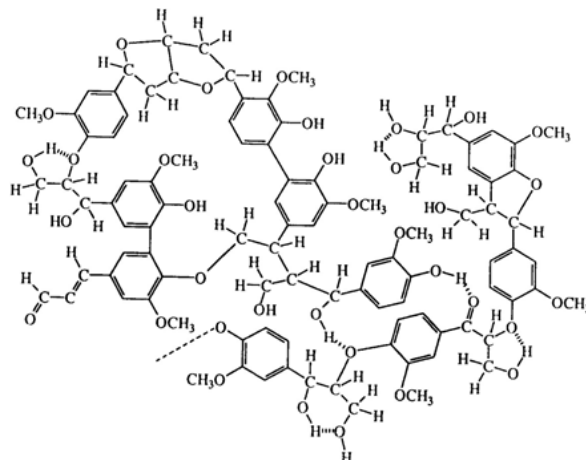
**Figura 5** – Estrutura da hemicelulose.



Fonte: VIVENZA, 2010.

A lignina é o terceiro polímero natural presente na natureza depois das celulosas e hemiceluloses (BURANOV *et al.*, 2008). Este composto é representado por um polímero tridimensional complexo (macromolécula) que ocorre predominantemente no xilema de 32 plantas mais tenras (ARGYROPOULOS *et al.*, 1998; HATFILED *et al.*, 2005). A Figura 6 ilustra uma seção do polímero de lignina.

**Figura 6** – Estrutura da lignina.



**Fonte:** ROSA & GARCIA, 2009.

Toda e qualquer biomassa necessita de pré-tratamentos para saber mais sobre sua composição, teor alcóolico, dentre outras características. Existem vários métodos de tratamento: físicos, químicos, biológicos e métodos combinados.

### **3.5 Pré-tratamento**

O pré-tratamento é realizado para trazer uma alteração no tamanho e estrutura da biomassa macroscópico e microscópico, bem como a estrutura e composição química submicroscópica. Isso faz com que a biomassa lignocelulósica susceptíveis à hidrólise rápida tenha rendimentos mais elevados de açúcares monoméricos.

De acordo com Sun e Cheng (2002), os principais requisitos para um bom pré-tratamento são: a) Resultar em alta recuperação de todos os carboidratos; b) Permitir alta digestibilidade da celulose, após subsequente hidrólise enzimática; c) Evitar a formação de produtos de degradação de açúcares e lignina que são inibitórios para a hidrólise e fermentação; d) Demandar pouca energia ou permitir que a energia empregada possa ser reutilizada em outras etapas do processo na forma de calor; e) Resultar em elevada concentração de sólidos, bem como em altas concentrações de açúcares liberados na fração líquida e f) Ter baixos custos operacionais.



O pré-tratamento ácido objetiva romper a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização da hemicelulose no meio ácido, o que promoverá um aumento da digestibilidade da celulose nas etapas posteriores (RABELO, 2010).

Geralmente os ácidos utilizados são o sulfúrico, clorídrico e o fosfórico. Já o alcalino envolve o uso de bases, tais como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e hidróxido de amônio. O uso de um álcali provoca a degradação do éster e das cadeias glicosídicas, resultando na alteração estrutural da lignina, inchaço da celulose, descristalização parcial de celulose, e parcial da hemicelulose (BRODEUR *et al.*, 2011).

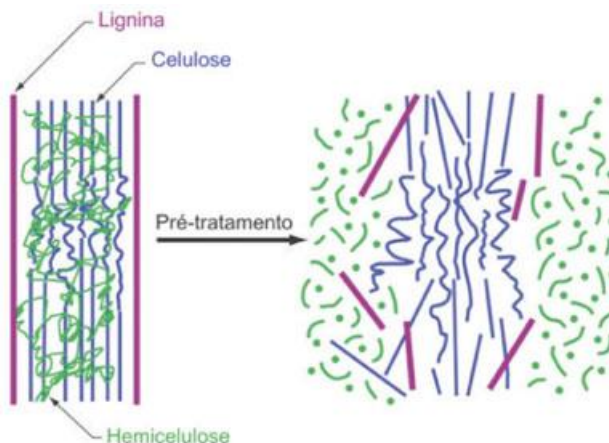
Enquanto que o pré-tratamento com solventes orgânicos é utilizado para promover a deslignificação do material lignocelulósico, através da solubilização da lignina e de parte da hemicelulose. Os solventes mais utilizados são etanol, metanol, propanol e acetona (SARKAR *et al.*, 2012).

Uma análise do pré-tratamento é feita com o líquido e o sólido insolúvel em água após o processo, principalmente referente à quantidade de açúcares presentes em cada fração, fazendo-se uma relação da quantidade recuperada de carboidratos totais na biomassa antes do pré-tratamento e após todo o processo de hidrólise. Após o pré-tratamento é importante realizar:

- a) Hidrólise enzimática do sólido insolúvel em água;
- b) Fermentação da fração líquida para verificar se há a necessidade de uma diluição pela presença de inibidores do crescimento microbiano;
- c) Fermentação do hidrolisado obtido a partir do sólido insolúvel e
- d) Verificar a disponibilidade de se obter produtos de valor agregado das frações dos pré-tratados (AGBOR *et al.*, 2011).

O pré-tratamento deve ser seletivo e funcional garantindo a acessibilidade da celulose, ser eficiente em termos de rendimento, evitar a degradação de carboidratos, apresentar consumo reduzido de energia e insumos. O pré-tratamento é composto por uma série de operações que, aplicadas aos materiais lignocelulósicos de forma que desorganize a estrutura da biomassa celulósica, como mostra a Figura 7.

**Figura 7** – Esquema da desorganização da biomassa celulósica.



**Fonte:** SANTOS *et al.*, 2012.

Após o efetivo pré-tratamento a biomassa está pronta, tanto para a hidrólise e depois para a fermentação ou diretamente para a fermentação.

### **3.6 Fermentação**

Apesar do Brasil ser pioneiro e líder em processos de fermentação para produção de biocombustíveis, ainda existem muitos problemas que precisam de maiores cuidados. Na indústria de produção de etanol brasileiro, a fermentação é um processo bioquímico em que a glicose, frutose e sacarose são metabolizadas em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentadores. (DELLA-BIANCA *et al.*, 2013).

A fermentação é um processo de liberação de energia que ocorre sem a participação do oxigênio (processo anaeróbio). A glicose é uma das substâncias mais empregadas pelos microorganismos como ponto de partida na fermentação. (SÓ BIOLOGIA, 2016)

A fermentação alcoólica inclui outras condições de estresse, tais como a pressão osmótica e o aumento da concentração de etanol (GUIMARÃES, 2006). O teor de etanol pode modificar o grau de polaridade da membrana celular. Em concentrações elevadas, o teor de etanol reduz também a multiplicação e a viabilidade da levedura (LYND 1996).

A via de inibição é complexa e inclui diversos mecanismos, que dentre eles, incluem a desnaturação e a inibição de enzimas e de danos para a membrana plasmática, por meio de modificações à sua permeabilidade. Os fosfolípidios presentes na membrana plasmática desempenham um papel importante no mecanismo de tolerância ao etanol (D'AMORE e STEWART, 1987).

De acordo com Guimarães (2006), os efeitos tóxicos do etanol na *Saccharomyces cerevisiae* pode envolver as modificações na composição lipídica da membrana, redução da atividade metabólica, a inibição do transporte da glicose para dentro da célula, a inibição do crescimento e da viabilidade das células e a inibição da produção de etanol.

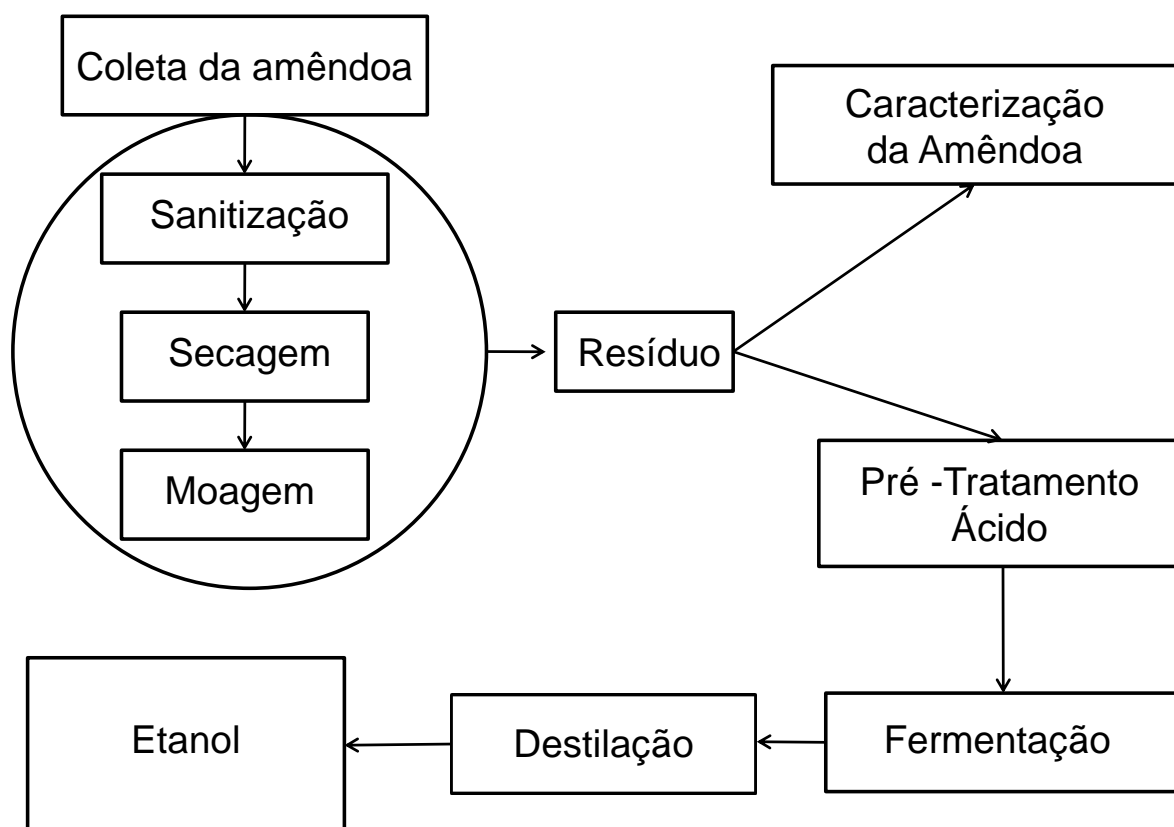
Ao término da fermentação o etanol é separado por destilação que é um método ou processo físico de separação de uma mistura de líquidos ou de sólidos dissolvidos em seus componentes. Esse processo é caracterizado pelo fato de o vapor formado possuir uma composição diferente do líquido residual. O vapor é condensado e o produto obtido é conhecido como destilado (SARDELLA, 1997). Nesse processo, é importante que a substância a ser destilada seja volátil na temperatura utilizada. O primeiro documento impresso e largamente difundido na sociedade sobre a aplicação do processo de destilação deve-se a Brunswig (Dekker, 1993; Beltran, 1996), publicado em 1500, embora existam relatos históricos que os alquimistas alexandrinos e árabes tenham sido os precursores da técnica.

Assim, acerca do que foi visto, a revisão bibliográfica apresentada, mostra que não existem trabalhos na literatura sobre o uso do fruto da *Terminalia catappa* Linn para produção de etanol. Assim, este trabalho tem como finalidade o estudo do pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa* Linn para produção de etanol de segunda geração. A seguir será apresentada a metodologia utilizada para a realização destes estudos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo proposto neste trabalho envolve analisar o pré-tratamento ácido da *Terminalia catappa Linn* para produção de etanol de segunda geração e seguirá as etapas descritas no diagrama apresentado na Figura 8, que foram desenvolvidas nos laboratórios de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) e Laboratório de Ensino em Engenharia Química (LEEQ), ambos situados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

**Figura 8** – Diagrama das etapas do estudo pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa Linn* para produção de etanol de segunda geração.



Fonte: AUTORA, 2016.

##### 4.1 Coleta e processamento da amêndoa

Os frutos foram coletados das matrizes de *Terminalia catappa Linn*, localizadas no Câmpus da Universidade Federal de Alagoas, que fica em Maceió - Al, Brasil. Os mesmos foram submetidos a seguintes etapas:

### **Sanitização**

As amêndoas passaram por um processo de sanitização com hipoclorito de sódio a 100 ppm por 15 minutos. Após esse tempo, foram lavadas em água corrente. A polpa foi separada dos caroços, e cortadas em tamanhos menores manualmente (Figura 9)

**Figura 9** – Polpa das amêndoas.



**Fonte:** AUTORA, 2016.

### **Secagem**

Após sanitização, a polpa foi colocada em estufa, em temperatura de 45°C a 60°C por 48h e em seguida armazenada em um dessecador.

### **Moagem**

Depois da etapa de secagem, a polpa seca, foi triturada num liquidificador modelo comercial, marca skymesen, para obter uma farinha *in natura* (Figura 10). A mesma sera caracterizada físico-quimicamente e posteriormente passada por um processo de pré-tratamento ácido.

**Figura 10:** Amêndoas liquidificadas.



Fonte: AUTORA, 2016.

#### **4.2 Caracterizações da amêndoa**

A amêndoa *Terminalia catappa* foi caracterizada para determinação de suas propriedades físico-química, através de testes laboratoriais.

##### **Acidez**

A acidez foi determinada conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (1985). Este método baseia-se na titulação de neutralização de ácidos com solução padronizada de álcali (solução de NaOH 0,1 N) e com o uso de indicador fenolftaleína 1%. O procedimento será descrito a seguir.

A amostra foi preparada com a mistura de 2 g de fibra com 50 mL de água destilada, deixando-a sob agitação por 30 min, seguida de decantação por 10 min. A parte líquida é retirada e titulada com solução de NaOH a 0,1 N, adicionando-se à solução 2 a 3 gotas de fenolftaleína. O resultado foi obtido pela Equação (1):

$$Acidez(mL/100g) = \frac{V \cdot N \cdot f \cdot 100}{M} \quad (1)$$

Onde:

$V$  = volume gasto na titulação da solução de NaOH, em mL

$N$  = normalidade da solução de NaOH

$f$  = fator de correção da solução de NaOH

$M$  = massa tomada de amostra, em g

### **Umidade**

A umidade da fibra da amênda *Terminalia catappa Linn* foi determinada de acordo com o método de aquecimento direto. Este método baseia-se na quantificação do peso, devido à perda de água por evaporação, que foi determinado por dessecação direta em estufa a 105°C.

O procedimento foi realizado colocando-se na estufa a 105°C, por no mínimo 1 hora, uma cápsula de porcelana ou de metal previamente identificada. Transferindo-se para o dessecador por no mínimo 15 minutos e pesando-se em balança analítica. Foram coletados 2 g de amostra neste recipiente previamente tarado e transferidos para a estufa a 105°C por 3 horas.

Após este período, o material foi resfriado em dessecador por 15 minutos e pesado. Estas operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até o peso constante da amostra. O percentual de umidade é obtido através da Equação (2):

$$Umidade(\%) = \frac{Massa \text{ úmida} - Massa \text{ seca}}{Massa \text{ úmida}} * 100 \quad (2)$$

### **Resíduo mineral fixo (Cinzas)**

Para determinação do teor de cinzas foi coletado 2 g da fibra da amênda *Terminalia catappa* para ser incinerado em mufla a 550°C por aproximadamente 4 horas. O teor de cinzas se dá a partir da Equação 3.

$$Cinzas(\%) = \frac{Massa\ final}{Massa\ inicial} * 100 \quad (3)$$

Onde: % cinzas = percentual em massa de cinzas; Massa final = massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); Massa inicial = massa da amostra em base seca.

### **pH**

Para medição de pH foi utilizado pHômetro de bancada digital PHTER PHS-3B, com controle de temperatura.

### **Sólidos solúveis totais (Brix)**

A porcentagem em massa de sólidos dissolvidos em uma solução foi determinada com auxílio do refratômetro. O índice de refração de uma solução é uma medida do teor de sacarose e seu conceito é estendido para indicar sólidos solúveis ou Brix em soluções impuras.

Foi utilizado o refratômetro digital, HANNA HI 96801 Refractometer, que já indica o valor na temperatura de 20°C. Para aferi-lo, fez-se necessário a leitura com água destilada, devendo a mesma apresentar índice de refração igual a zero.

### **Açúcares redutores totais (ART)**

As análises de ART foram obtidas por espectrofotometria, através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959).

Para determinação da concentração de açúcares redutores totais foi preparada uma solução contendo 0,5g de fibra da amêndoa com 20 mL de água destilada. O cálculo do ART é realizado de acordo com a equação (4).

$$ART \left( \frac{g}{100g} \right) = \frac{Absorbância * fator\ da\ curva * diluição}{Concentração\ da\ amostra} * 100 \quad (4)$$



### **Proteína**

Numa primeira etapa, utilizando o Método de Kjeldahl na digestão da matéria orgânica – pesou-se 0,5 g da amostra para um tubo de Kjeldahl e adicionou-se 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1: 0,8). Depois foi adicionado ao tubo 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Acoplado o tubo ao digestor de Kjeldahl. A cada 15 min eleva a temperatura suavemente (50°C) até que a mesma chegue a 350°C. Deixa esfriar. Segunda etapa - destilação do nitrogênio – transferi-se para um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de ácido bórico a 4% e adiciona-se 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25 e 2 gotas de indicador verde de bromocresol 0,2%, adiciona-se ao tubo de 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%. Acoplado o tubo ao destilador de Buchi, adiciona NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa). Terceira etapa - titulação do nitrogênio - titula a solução do erlenmeyer da segunda etapa, com ácido clorídrico 0,1 N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada.

#### *Cálculo para Proteína*

$$Proteína_{Total}(g/100g) = \frac{V_{HCl} \cdot f_{HCl} \cdot N_{HCl} \cdot F \cdot 1,4}{P}$$

V = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N.

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N.

F = fator de correspondência nitrogênio – proteína. O valor de F para alimentos em geral é 6,25.

P = massa tomada de amostra.

### **Fibra**

Foi utilizado o Método de Hennenberg (1864) no qual, pesa-se em um becker de 200 mL, 1g de amostra e adiciona-se 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,25%. Deixa-se em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker

perdido por evaporação. Filtra-se em papel de filtro, lavando o material com 25 mL de água destilada quente. Transfere o material retido no papel de filtro para um becker de 200 mL com a ajuda de 50 mL de NaOH a 1,25%. Deixa-se em ebulição por 30 min, determina-se a fibra bruta completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Filtra em papel de filtro quantitativo previamente tarado, lava com 100 mL de água quente e secar em estufa a 100°C por aproximadamente 2 horas. Pesa o papel com resíduo e anota o peso. Leva à mufla em cadinho previamente tarado a 550°C.

### **Caracterização da constituição química por cromatografia líquida de elevada eficiência - HPLC**

Foram determinadas, por HPLC da *Shimadzu Detector: IR*, as principais classes de substâncias presentes no fruto da amêndoa pré-tratada.

A caracterização da constituição química da amêndoa por HPLC com a fase móvel sendo utilizada uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com pH = 1,27; com um fluxo de 0,7 mL/min e com a temperatura da coluna e do detector de 30° C, e o cromatograma dos padrões analíticos para HPLC.

Os componentes da polpa do fruto da amêndoa pré-tratada foram separados sequencialmente, ao passarem pela coluna de cromatografia. Para posterior identificação das moléculas separadas por HPLC e os picos de absorvância dos componentes da amostra foram avaliados através de curvas de calibração.

### **4.3 Estudo do pré-tratamento ácido**

Deve-se destacar que as escolhas dos níveis das variáveis para o estudo do pré-tratamento ácido seguiram critérios coerentes, relacionados com limitações ou valores previamente conhecidos. As temperaturas escolhidas foram devido às restrições da autoclave utilizada; Com relação ao tempo, os níveis escolhidos foram com o intuito de abranger uma faixa de resultados já indicados na literatura (Santos 2014) e as concentrações de ácido sulfúrico usadas foram devido a trabalhos já realizados na literatura (Santos 2014), observando que para concentrações inferiores a 0,5% não se obtém resultados efetivos e acima de

5;0% se torna inviável devido ao gasto de material e grande geração de resíduos ácidos.

O pré-tratamento ácido foi avaliado com ácido sulfúrico diluído e as variáveis de interesse estudadas foram a concentração de ácido sulfúrico (2,5% e 5%), a concentração de biomassa (5g de resíduo/100 mL de solução ácida) e tempo de aquecimento (15 min a 30 min), em temperaturas variando de 111° C a 120° C, organizando-se num planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Quadro 3) com três repetições de amostras.

**Quadro 3** – Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup>.

Ensaio	Planejamento	Concentração ácido (%)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	- - -	2,5	15	111
2	+ - -	5,0	15	111
3	- + -	2,5	30	111
4	+ + -	5,0	30	111
5	- - +	2,5	15	120
6	+ - +	5,0	15	120
7	- + +	2,5	30	120
8	+ + +	5,0	30	120

Fonte: AUTORA, 2016.

Para cada ensaio do Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> verificou-se a melhor eficiência da concentração em relação à desassimilação de açúcares redutores, rendimento mássico e teor de sólidos solúveis por grama de biomassa pré-tratada liberada. Após o pré-tratamento as amostras foram fermentadas e destiladas com a finalidade de produzir etanol.

#### 4.4 Fermentação etanólica

A fermentação utilizada foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de fermento biológico seco instantâneo, cultivada em meio de cultivo líquido YPD (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona). Para o preparo da suspensão, após atingir a fase exponencial de crescimento, as células foram centrifugadas a 4500 rpm durante 5 min, eliminando o meio sobrenadante.

O mesmo procedimento de centrifugação foi realizado para a lavagem das células em água estéril, retirando qualquer resquício do meio de cultura. Após o

descarte do sobrenadante, as células foram suspensas em água estéril, de forma a se obter uma densidade ótica a 600 nm entre 0,5 e 0,6, equivalente a uma concentração em torno de  $10^7$  cél/mL.

Com isso inoculou-se um volume da suspensão de células a um caldo suplementado com  $MgSO_4$  (1000 ppm),  $NH_4H_2PO_4$  (1000 ppm) e  $CaCl_2$  (100 ppm), em um volume total de 10% ( $V_{suspensão}/V_{hidrolisado}$ ).

A fermentação foi encerrada após 24 horas, sendo determinada a concentração de ART e teor alcoólico, pelo método do dicromato (AOAC, 2002), adaptado por Abud (1997). Também foi realizado o peso seco celular no início e no final do processo, após o processo de centrifugação, ressuspendendo as células centrifugadas a 4500 rpm por 5 min em água estéril e, após secagem em estufa a  $105^\circ C$  até peso constante, através de gravimetria.

O rendimento da fermentação ( $R_f$ ) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (g/L) e a quantidade de ART presente inicialmente (g/L), através da Equação 5. Já a eficiência da fermentação ( $E_f$ ) foi determinada pela relação entre o rendimento real da fermentação ( $R_f$ ) e o rendimento teórico de 0,51, conforme Equação 6 (Gomes, 2015).

$$R_f = \frac{\text{Etanol Produzido (g/L)}}{ART_{\text{inicial (g/L)}}} \quad (5)$$

$$E_f = \frac{\text{Rendimento real}}{\text{Rendimento teórico (0,51)}} \quad (6)$$

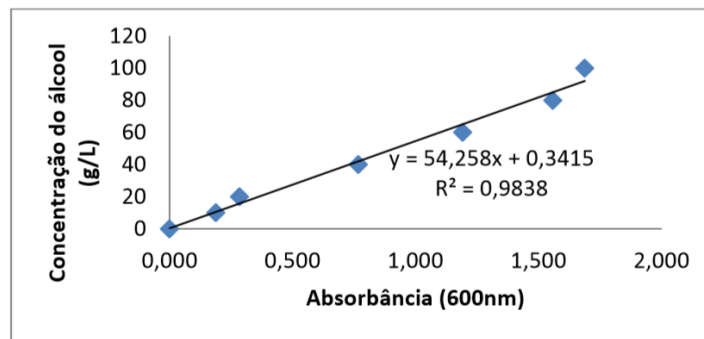
#### **4.5 Destilação**

A destilação foi realizada conforme Abud (1997). Destilou-se cada amostra por 3 minutos, contados após o início da fervura, completando o volume para um balão de 50mL com água destilada. Transferiu-se 2mL deste destilado, o qual foi submetido a uma reação a  $60^\circ C$  por 30 minutos com 2mL de solução de

dicromato de potássio e leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 600nm.

O teor alcoólico foi determinado por destilação, utilizando-se o método espectrofotométrico a partir do dicromato de potássio. A concentração de etanol foi determinada a partir de uma curva de calibração do dicromato de potássio (Figura 11), com amostras de etanol de concentração conhecidas, submetidas à mesma reação.

**Figura 11** – Curva de calibração do dicromato de potássio.



Fonte: AUTORA, 2016.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do estudo do pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa* Linn para produção de etanol de segunda geração e suas respectivas discussões serão apresentadas a seguir:

### 5.1 Propriedades da amêndoa

O Quadro 4 apresenta os dados das propriedades do fruto da *Terminalia catappa* Linn e outros encontrados na literatura.

**Quadro 4** – Dados das propriedades do fruto da *Terminalia catappa* Linn, resíduo da Graviola, casca do Maracujá, bagaço da Laranja e bagaço da Cana-de-açúcar.

Caracterização	Amêndoa*	Resíduo da Graviola**	Casca do Maracujá**	Bagaço da Laranja**	Bagaço da Cana-de-Açúcar ***
Acidez (mL/100g)	3,85	-	6,3	-	2,98
Umidade (%)	8,39	9,69	8,82	10,05	49,79
Cinzas (%)	6,27	3,50	2,02	3,46	1,6
pH	3,85	-	-	-	5,5
° Brix	8,87	-	-	-	16,5
ART (g/100g)	27,68	-	-	-	16,3
Proteína (g/100g)	4,02	7,37	4,68	3,38	-
Fibra (%)	20	9,78	13,79	11,23	39,92

\*Fonte: AUTORA, 2016.

\*\*Fonte: SILVA, 2014.

\*\*\*Fonte: GOMES, 2015.

Observa-se no Quadro 4, que a acidez da amêndoa comparada com à casca do maracujá e o bagaço da cana-de-açúcar está num valor mediano, isso é uma vantagem, pois o meio ácido ataca os polissacarídeos, especialmente as hemiceluloses, que são mais fáceis de hidrolisar do que a celulose (SILVA *et al.*, 2015).

Nota-se também no Quadro 4 que o valor da umidade para a amêndoa está próximo dos valores encontrados para os resíduos da graviola, casca do maracujá e bagaço da laranja, que é da ordem de 8,39%. Sendo muito abaixo do encontrado para o bagaço da cana-de-açúcar, passando a ser um benefício, pois

segundo Moreira *et al.*, (2015), quando realizado o armazenamento de uma amostra com umidade elevada, ocorre um aumento no metabolismo, favorecendo o crescimento microbiano e por consequência a contaminação por fungos.

Observa-se no mesmo Quadro, que o percentual de cinzas é alto em relação aos demais. Isso pode ser considerado uma desvantagem, porque durante o pré-tratamento os sais contidos na biomassa se solubilizam nas amostras pré-tratadas. Este aumento na concentração de íons leva a um aumento da pressão osmótica no meio, o que dificulta a fermentabilidade das amostras pré-tratadas geradas (SILVA *et al.*, 2015).

Nos processos de fermentação o pH é um importante fator, sendo capaz de exercer grande influência sobre a produção de etanol. O pH ótimo de fermentação pode variar devido aos diferentes meios de fermentação empregados e condições de cultivo. (CABRAL, *et al.*, 2009). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcoólica em pH acima de 3,8. (Dorta, 2006), assim, como o pH da amêndoa é de 3,85; logo encontra-se num valor desejado.

Estudos mostram que em altas concentrações de °Brix mesmo em fermentações mais curtas ocorre o efeito da pressão osmótica nas leveduras, uma vez que, leveduras são agentes ativos, responsáveis pela fermentação alcoólica, e por isso, a escolha da linhagem apropriada é de fundamental importância para o êxito da fermentação (PACHECO, 2010). Sendo a concentração de 18<sup>o</sup> Brix a ideal para que se tenha uma produção máxima de etanol (CEBALHOS-SCHIAVONE, 2009). O °Brix da amêndoa (Quadro 4) tem um valor de 8,87; este valor não está próximo do ideal, está em valor menor, assim, desfavorecendo o efeito da pressão osmótica nas leveduras.

O valor de ART da amêndoa, que é da ordem de 27,68g/100g, é maior em relação ao bagaço da cana-de-açúcar (Quadro 4). Ripoli (2004) sugere que ART igual ou maior que o valor de 15g/100g é mais indicado para uma boa fermentação, logo o valor do ART da amêndoa está dentro dos padrões.

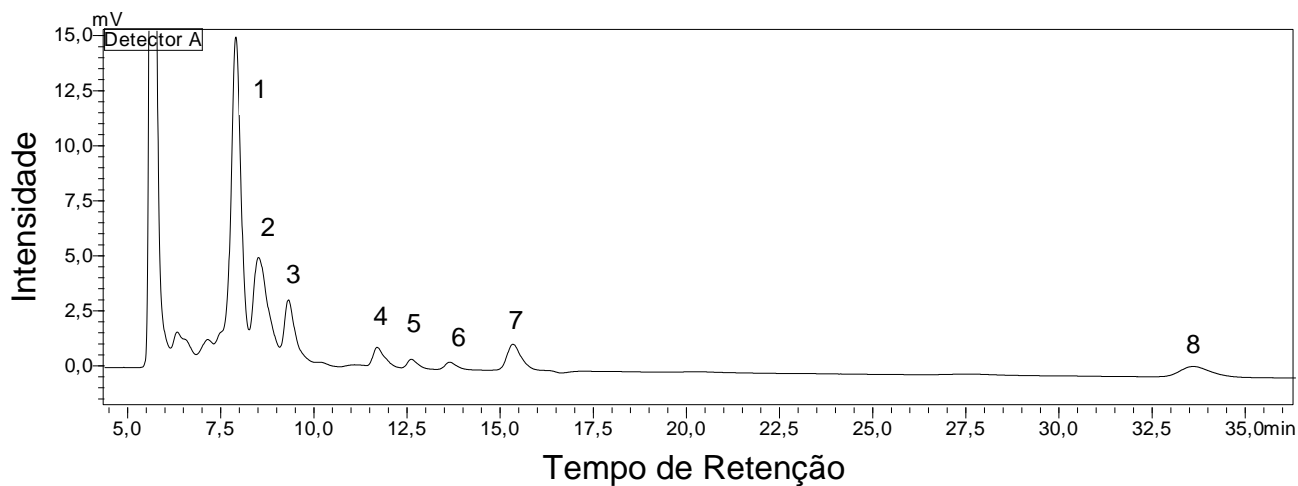
Percebe-se ainda no Quadro 4 que o valor de proteína para a amêndoa é próximo aos valores dos resíduos da graviola, casca do maracujá e bagaço da

laranja; e o valor de fibra é menor que o do bagaço de cana-de-açúcar, porém maior que os demais do Quadro 4.

### **Caracterização da constituição química por cromatografia líquida de elevada eficiência - HPLC**

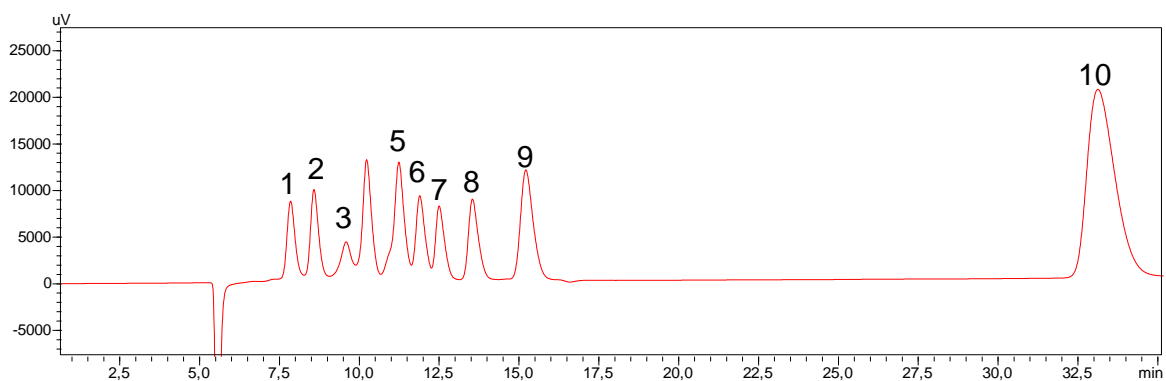
A Figura 12 apresenta o cromatograma da caracterização da constituição química da amêndoa por HPLC e a Figura 13 apresenta o cromatograma dos padrões analíticos para HPLC.

**Figura 12** – Cromatograma da caracterização da constituição química da amêndoa por HPLC.



**Fonte:** AUTORA, 2016.



**Figura 13** – Cromatograma dos padrões analíticos para HPLC.

- |                  |                     |
|------------------|---------------------|
| 1. Glicose       | 6. Dihidroxiacetona |
| 2. Frutose       | 7. Ácido Fórmico    |
| 3. Gliceraldeído | 8. Ácido Acético    |
| 4. Piruraldeído  | 9. Ácido Levulínico |
| 5. Ácido Lático  | 10. HMF             |

**Fonte:** AUTORA, 2016.

Obsevando a Figura 12 e 13 os picos da constituição química da amêndoa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 da Figura 12, são referentes aos compostos: glicose, frutose, gliceraldeído, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico e HMF, quando comparados aos picos padrões analíticos da Figura 13. Esses picos da constituição química da amêndoa foram identificados a partir do tempo de retenção de padrões analíticos.

Alguns destes compostos encontrados (como o ácido acético, o furfural e 5 hidroximetilfurfural) na amêndoa são inibidores do crescimento de microrganismos (SARKAR *et al.*, 2012; MICHAEL e ORLYGSSON, 2015). Relatos apontam que no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, 5-HMF inibiu significativamente o crescimento celular e produção de etanol (SUNG *et al.*, 2013), logo as amostras pré-tratadas a serem usadas para a fermentação, por conseguinte, precisariam ter sido desintoxicadas.

## **5.2 Estudo das condições de pré-tratamento ácido da matéria-prima**

O Quadro 5 apresenta a matriz de planejamento da amêndoa, com todas as condições do pré-tratamento ácido, de acordo com o planejamento  $2^3$  e as respostas obtidas de ART.

**Quadro 5 – Matriz de planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.**

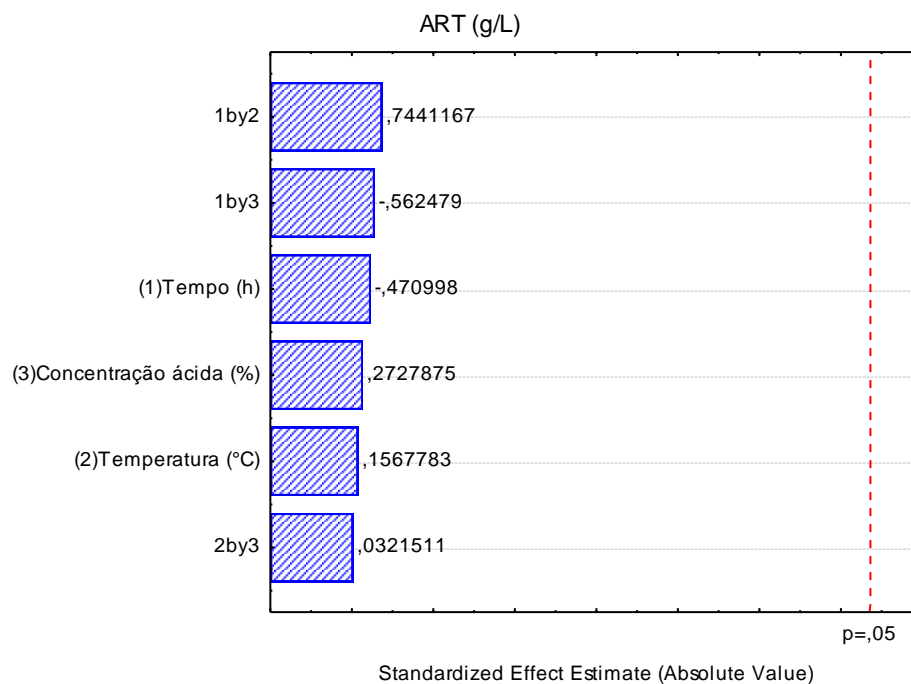
Ensaio	Planejamento	Conc. Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. °C	ART inicial (g/l)
1	- - -	2,5	15	111	44,10
2	+ - -	5,0	15	111	51,20
3	- + -	2,5	30	111	48,96
4	+ + -	5,0	30	111	42,98
5	- - +	2,5	15	120	56,43
6	+ - +	5,0	15	120	38,12
7	- + +	2,5	30	120	45,22
8	+ + +	5,0	30	120	47,59

Fonte: AUTORA, 2016.

Pelo Quadro 5, verifica-se que a melhor condição, com maior percentual de ART inicial, ou seja, antes da fermentação para a amêndoa foi a condição 5 em que se tem menor concentração de ácido, menor tempo, porém, numa maior temperatura; com 56,43 g/L. Verifica-se também que a menor condição foi mostrada na condição 6 em que se tem maior concentração de ácido, maior temperatura, porém, num menor tempo; com 38,12 g/L; no entanto, suas médias foram de 43,17g/L.

Em posse dos resultados foi feito o Gráfico de Pareto para o pré-tratamento ácido para determinar possíveis efeitos principais e de interação para o planejamento realizado, apresentado na Figura 16.

**Figura 14** – Gráfico de Pareto para o pré-tratamento ácido.



**Fonte:** AUTORA, 2016.

Nota-se pela Figura 14 que a análise estatística não apresentou nenhuma significância para os fatores analisados: tempo, temperatura e concentração de ácido, na faixa estudada, levando a acreditar que a biomassa foi digerida suficientemente em todos os casos.

### **5.3 Fermentação etanólica**

O Quadro 6 mostra os resultados dos Açúcares Redutores Totais, Teores Alcoólicos, Rendimentos das Fermentações e Eficiência das Fermentações para os ensaios após a etapa de fermentação.

**Quadro 6** – Resultados dos Açúcares Redutores Totais, Teores Alcolóicos, Rendimentos das Fermentações e Eficiência das Fermentações para os ensaios após a etapa de fermentação.

Ensaio	ART inicial (g/l)	Teor alcóolico (g/l)	Rendimento da Fermentação (%)	Eficiência da Fermentação (%)
1	44,10	9,38	21	42
2	51,20	12,64	25	48
3	48,96	9,38	19	37
4	42,98	9,93	23	45
5	56,43	9,93	18	34
6	38,12	11,01	28	57
7	45,22	9,93	22	43
8	47,59	14,27	30	59

Fonte: AUTORA, 2016.

Percebe-se no Quadro 6, que a maior eficiência fermentativa se deu para o ensaio 8, assim como se obteve, também, a maior quantidade de etanol. O teor de etanol produzido foi de 14,27 g/L e a eficiência fermentativa de 59%. Este ensaio possui maior concentração de ácido (5,0%), tempo (30min) e temperatura (120°C).

Observa-se também no Quadro 6, que o ensaio que obteve maior teor de etanol (ensaio 8) produzido, não foi o que teve maior ART (ensaio 5). Isto se deve ao fato das células de levedura não serem capazes de metabolizar todos os açúcares redutores presentes na amostra, ou seja, a porcentagem de açúcares redutores que a levedura conseguiu metabolizar no ensaio 5 foi pequena.

Diversos produtos de degradação, tais como o ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados (FUGITA, 2010). As tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo (LEE, 1997).

Em seus estudos, Silva *et al.* (2015) reporta concentrações de 15,9 g/L de etanol para fermentação com dois tipos de leveduras diferentes da cana gigante (*Arundo donax L.*), passando antes por uma hidrólise enzimática.

Santos (2014) obteve um valor 9,3 g/L de etanol para a palha de milho na condição pré-tratamento ácido (15 min; 120°C e 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e de 5,5 g/L para o sabugo que passou por pré-tratamento hidrotérmico (195°C por 10 min).

Mesmo com alguns fatores ambientais, como cinzas, não estarem dentro de faixas de valores desejáveis e possuindo compostos inibidores como furfural e 5-hidroximetil-furfural (5-HMF), a produção de etanol teve valores compatíveis com a literatura. Assim sendo, este pré-tratamento ácido do fruto da *Terminalia catappa* Linn para produção de etanol de segunda geração, na faixa estudada, mostra ser promissor

## 6 CONCLUSÕES

De forma geral pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos por este trabalho foram alcançados, ou seja, a biomassa estudada propiciou etanol. Diante disso, podemos, também, concluir que o fruto da *Terminalia catappa Linn* pode vir a se constituir numa alternativa promissora para a produção de etanol de segunda geração. Tendo em vista que a maior eficiência fermentativa se deu para o ensaio 8, assim como se obteve, também, a maior quantidade de etanol. O teor de etanol produzido foi de 14,27 g/L e a eficiência fermentativa de 59%, na condição pré-tratamento ácido (30 min; 120°C e 5,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

A análise estatística não apresentou nenhuma significância para os fatores analisados: tempo, temperatura e concentração de ácido, na faixa estudada, levando a acreditar que a biomassa foi digerida suficientemente em todos os casos. Diante disso, haveria necessidade de um estudo mais aprofundado em relação a temperatura, tempo e concentração de ácido, variando a faixa de estudo e a quantidade de pontos a serem avaliados dentro desta faixa.

Alguns compostos encontrados (como o ácido acético, o furfural e 5 hidroximetilfurfural) na amêndoa são inibidores do crescimento de microrganismos, logo as amostras pré-tratadas a serem usadas para a fermentação, por conseguinte, precisariam ter sido desintoxicadas.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se eficiente no processo fermentativo dos açúcares fermentescíveis presentes na amêndoa pré-tratada. Os valores encontrados nas características físico-químicas da amêndoa, alguns deles, como cinzas, não estavam dentro de faixas de valores desejáveis, desta forma há a necessidade de otimização dos parâmetros da fermentação.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO

Em vista dos resultados apresentados, sugere-se como continuidade deste trabalho:

- Análise de viabilidade econômica de processo, com detalhamento de concentração de produção desses resíduos e logística, do beneficiamento, ou seja, coleta, secagem e moagem, ao armazenamento e transporte para a unidade produtora;
- Otimizações das condições de pré-tratamento, utilizando menores concentrações de ácido ou base e tempo. Também, atuar em uma maior faixa de temperatura, diminuindo custos e severidade para o processo;
- O estudo da destoxificação das amostras antes da fermentação;
- Uso de complexos enzimáticos e/ou remoção de pectina para verificar sua influência no processo de hidrólise enzimática;
- Estudo da otimização dos parâmetros da fermentação
- Detalhamento de etapas de fermentação e utilização de cepas que fermentem tanto hexoses quanto pentoses;
- Análises estatísticas com os resultados obtidos visando verificar a dependência do tipo de processo e variáveis analisadas.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica de amiláceos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo- USP. São Paulo, 1997.
- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.675–685, 2011.
- ANGEL, M. H. et al. **Almendro de la India: potencial biológico valioso**. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, v. 22, n. 1, 2003.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Gaithersburg: Ed. William Horwitz, 2002.
- BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999.
- BELTRAN, M.H.R. Destilação: **A arte de extrair virtudes**. Química Nova na Escola. n. 4, p. 24-27, 1996.
- BRODEUR, G. et al. **Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review**. Enzyme Research, Tallahassee, p.1-17, 2011.
- BURANOV, A.U.; MAZZA, G. **Lignin in straw of herbaceous crops**. Industrial Crops and Products, v.28, p.237-259, 2008.
- CABRAL, J.R.S.; et al. Variação de caracteres em híbridos de abacaxizeiro obtidos de diferentes cruzamentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.4, p.1129-1134, 2009.
- CABRAL, M. M. S. **Aproveitamento da casca do coco verde para produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Mestrado. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. Alagoas. 2015.
- CANILHA, L.; et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p. 48-53, 2010.



CAVALCANTE, M.A. et al. **Características físicas químicas da Castanhola, Terminalia catappa L.** *Ciência Agrônômica*, Fortaleza, v. 17, n. 1, p. 111-116, 1986.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-deaçúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - Lactobacillus – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol 177f** (Dissertação) Faculdade de Ciência de alimentos - Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba- SP, 2009.

D' AMORE T e STEWART G. **Ethanol tolerance of yeast.** *Enzime Microbiol Technol.* 1987; 9: 322-330.

DE PAULA, A. A. **Caracterização físico-química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos da Terminalia catappa Linn.** Andréia Alves de Paula. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, (Dissertação Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, p 91. 2008.

DELLA-BIANCA B.E. et al. 2013. **What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 979-991.

DEKKER, M.; **A Review of: “Wettability ”** J.C. BERG, ed., New York, 1993 *Journal of Dispersion Science and Technology*

**Dicionário brasileiro de plantas medicinais.** Rio de Janeiro: Kosmos, p 409. 1946.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de Saccharomyces cerevisiae PE-2 e M-26 – Tese Doutorado - Rio Claro Estado de São Paulo, 2006**

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. **Balanco Energético Nacional – 2008 Relatório Síntese – Ano Base 2007.** Disponível em <[www.epe.gov.br](http://www.epe.gov.br)> Acesso em: 4 Ago. 2008.

EZEOKONKWO, C.A.; DODSON, W.L., 2004. **The potential of Terminalia catappa (tropical almond) seed as a source of dietary protein.** *Journal of Food Quality* 27 (3), 207- 219.

FERREIRA, L. E; et al. **Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle pleistocene sites, central Italy.** *The Journal of Parasitology*, 79:440-442, 1993.

FLORES, E.M. *Terminalia catappa L.; Tropical tree seed manual.* Species Descriptions, 2003. 2p. Disponível em:

[http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/ PDF. 2004-03-16.0017/file](http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/PDF.2004-03-16.0017/file)>.

FRANCIS, J. K. **Terminalia catappa L. Indian almond, almendra, Combretaceae, Combretum family** U. S. Forest Service. v. 23, p. 541-544, 1989.

FUGITA, T. P.L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2010   vii, 60 f. : il. ; 28 cm

GOMES. M. A.; **Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol 2G**, Universidade Federal de Alagoas, 2015

GHATAK, H. R. **Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.15, p.4042-4052, 2011.

GILMAN, E.F.; WATSON, D. G. **Terminalia catappa tropicalalmond.** Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. P 3. 1994.

GOLDEMBERG J. **Biomassa e energia.** Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil. Quim. Nova, Vol. 32, No. 3, 582-587, 2009

GONZÁLEZ-MENDOZA, M.; et al. **Valor nutricional de la semilla del almendrán (Terminalia catappa Linn).** Revista de la Facultad de Farmacia, vol. 47 p. 25-29, 2005.

GUIMARÃES, D. P. **Avaliação de estresse e do potencial fermentativo de isolados de saccharomyces na microvinificação da jaboticaba.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre. 2006.

HATFILED, R., FUKUSHIMA, R.S. **Can lignin be accurately measured?** Crops Science, 45, 832–839, 2005.

HENNEBERG, W. and F. STOHMANN. 1864. **Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer.** Vol. II. Schwetssehtke u. Sohn, Braunschweig, p. 324. (1864)

HOEGER. I.C.; et al. **Mechanical deconstruction of lignocellulose cell walls and their enzymatic saccharification.** Cellulose 20, p. 807–818, 2013.

HOEKMAN, S. K. **Biofuels in the U.S. – challenges and opportunities.** Renew Energy, v.34, p.14- 22, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas**: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3.ed. São Paulo, 1985. v.1, 533p.)

LORENZI, H.; et al. **Árvores Exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. 1ª.ed. Nova Odessa: Platarum, p 352. 2003.

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

LYND, L R. **Overview and evaluation of fuel ethanol production from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy**. Annu Rev Energy Environ v 21 p 403–465 1996.

MANDALOUFAS, M.; et al. **Energy balance analysis of the Brazilian alcohol for flex fuel production**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. V 43 p 403–414. 2015.

MENESES, C.H.S.G.; et al. Análise da arborização dos bairros do Mirante e Vila Cabral na cidade de Campina Grande – PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.3, nº 2, 2003.

MICHAEL. S S. e ORLYGSSON. J.. **Recent Advances in Second Generation Ethanol Production by Thermophilic Bacteria** Energies 2015, 8, 1-30; doi:10.3390/en8010001

MICHAELIS - **Moderno Dicionário Língua Portuguesa- 2000**

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Anal. Chem. v.31, p 426-428. 1959.

MME: Ministerio de Minas e Energia 2015: **Resenha Energética Brasileira – Resultados de 2014**

MOREIRA, C. S.; et al. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. Ciência e Natura, Santa Maria, v. 37 n. 4 set-dez. 2015, p. 55-63 **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM** ISSN impressa: 0100-8307 ISSN on-line: 2179-460X

NAIK, S. N.; et al. **Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review** Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) 578–597

ORLYGSSON J. **Ethanol production from biomass by a moderate thermophile**, *Clostridium* AK<sub>1</sub>. Icel. Agric. Sci. 25, 25–35. 2015.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Uberlândia, 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em: <[http://www.bdt.d.ufu.br/tde\\_arquivos/12/TDE-2010-04-12T170946Z-1890/Publico/thalita.pdf](http://www.bdt.d.ufu.br/tde_arquivos/12/TDE-2010-04-12T170946Z-1890/Publico/thalita.pdf)>. Acessado em: 12 out. 2010.

PASSOS, E.C.; et al. **Balance analysis of the Brazilian alcohol for flex fuel production**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. V 43 p 403–414. 2015.

PIMENTA, K. M. e OLIVEIRA, R. P. **Paspalum L. (Panicoideae: Poaceae) na Reserva Ecológica da Michelin**, Igrapiúna, Bahia: informações taxonômicas e ecológicas. In: *Semana de Biologia da UFBA, Salvador*. VI SEMBIO, p. 129-131. 2010.

PNPB - Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): **Trajatória, Situação Atual e Desafios**. v. 41 Nº 04 outubro - dezembro 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação e Otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração** – Campinas, SP, 2010.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica, 2004. 302 p.

ROSA, S.E. S.; GARCIA, J.L. F.; **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**. *Revista do BNDES*, 32, dezembro, 2009.

SARDELLA, A. *Curso de Química – Química Geral*. v. 1. 23ª ed. São Paulo: Ática, 1997.

SANTOS, F. A.; et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. *Química Nova*, v. 15, Nº.00, p. 1-7, 2012.

SANTOS, A.O.; et al. **Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n.103, p.277-281, 2008.

SANTOS. M. S. R.; **Estudo de pré - tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2g**, Universidade Federal de Alagoas, 2014

SARKAR, N.; et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview**. *Renewable Energy*, v. 37, p 19 – 27, 2012.

SERVICE, R. F. **Cellulosic ethanol at last? Large volumes of fuel from crop wastes will soon start flowing in the U.S.—unless policymakers balk**. *Science*, v. 345, p1111, 2014.

- SILVA, C.F.L.; et al. **Potential of giant (*Arundo donax L.*) for second generation ethanol production** – Electronic journal of biotechnology, Centro de Engenharia, Universidade Federal de Pelotas- Rio Grande do Sul, Brasil, 2015
- SILVA, F. V; **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 13, n. 20, p. 01-134, jul./dez. 2012
- SILVA, J. O.; et al. **Determinação da CTC radicular de gramíneas e leguminosas forrageiras**. Enciclopédia Biosfera, v 6: p 1-7, 2010.
- SILVA. C. E. F.; **Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G**. Universidade Federal de Alagoas, Dissertação de Mestrado – Engenharia Química, 2014
- SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo - EEL, 2009.
- SO BIOLOGIA - [www.sobiologia.com.br](http://www.sobiologia.com.br)
- STÖCKER. M.; **Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials**. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 9200–9211.
- SUNG, N. et al. **Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-Mycobacterium tuberculosis by photodynamic therapy**. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, v. 10, p.694-702, 2013.
- THAKUR, P.C. et al. **Comparative study of characteristics of biocompost produced by millipedes and earthworms**. *Advances in Applied Science Research*, v.2, n.3, p.94-98, 2011. Available from: Accessed: May 17, 2015.
- TEIXEIRA, H. L. **Composição química e perfil de ácidos graxos da castanha do fruto da castanhola (*Terminalia catappa Linn.*)**. / Helmo Lima Teixeira. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. (Dissertação Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. p 50 2010.
- THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. ***Terminalia catappa* (tropical almond), ver. 2.2**. In: ELEVITCH, C.R. (Ed.). **Species profiles for pacific Island agroforestry: permanent agriculture resources (PAR)**, 2006.
- TORRESI, S. I. C.; PARDINI, V. L.; FERREIRA, V. F. **Quím. Nova** vol.31 n. 8 São Paulo 2008 v 42. Nº 5, 2010.
- VARESCHI, E., **the exology of Lake Nakuru (Knya). II. Biomassa and spatial distribution of fish (*Tilapia graham Boulenger = Sarotherodon alcalicus graham Boulenger*)**. *Oecologia* 37:321-335. 1979

VIVENZA, P. A. D. **Avaliação da digestibilidade e consumo de fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e hemicelulose de dietas a base de cana de açúcar tratada com óxido de cálcio em diferentes tempos de hidrólise, utilizando-se novilhas holandês x zebu.** In: ZOOTECA NA AMAZÔNIA LEGAL, 1. Palmas, 2010.

WU, K. T.; TSAI, C. J.; CHEN, C. S.; CHEN, H. W. **The characteristics of torrefied microalgae.** Applied Energy. v 100. p 52-57. 2012.

WOSCH, L. F. O.; **O desafio do etanol brasileiro no cenário do comércio mundial,** Revista Paranaense de Desenvolvimento, Curitiba, n.118, p.07-40, jan./jun. 2010