



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

CENTRO DE TECNOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA

**Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na
produção de etanol 2G**

Maceió - AL
2014

CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA

**Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na
produção de etanol 2G**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade
Federal de Alagoas, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Karla de
Souza Abud

Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Maria
Rosas Garcia Almeida

Maceió - AL
2014

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

- S586a Silva, Carlos Eduardo de Farias.
Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G / Carlos Eduardo de Farias Silva. -- 2014.
101 f. : il., tabs., graf.,
- Orientadora: Ana Karla de Souza Abud.
Co-orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2014.
- Bibliografia: f. 86-95.
1. Frutas – Resíduos. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrólise enzimática.
4. Fermentação etanólica. Produção de bioetanol. Título.

CDU: 661.722

Carlos Eduardo de Farias Silva

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DE FRUTAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Alagoas, como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em Engenharia
Química.

Aprovada em: Maceió, 26 de setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Ana Karla de Souza Abud

Prof^a. Dr^a. Ana Karla de Souza Abud
(PPGEQ/UFAL - Orientadora)

Renata Almeida

Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(PPGEQ/UFAL - Coorientadora)

João Inácio Soletti

Prof. Dr. João Inácio Soletti
(PPGEQ/UFAL)

Rosineide Gomes da Silva Cruz

Prof^a Dr^a Rosineide Gomes da Silva Cruz
(UFSCar – Membro Externo)



“Tudo é considerado impossível até acontecer.”

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo direito à vida, aos ensinamentos e livramentos concedidos. Aos meus pais, Carlos José Silva e Marluce Oliveira de Farias, pelo carinho e atenção durante toda minha vida, e aos meus irmãos, tios, primos. Enfim, a minha família como um todo, por sempre torcerem por mim e acompanhar cada passo. Menção especial aos meus avós, José Antônio da Silva (*in memorian*), Isabel Maria da Conceição Silva, Francisca Silva de Farias (*in memorian*) e Manoel Florêncio de Farias (*in memorian*), pelos ensinamentos e por suas histórias de vida, que por si só já me mostraram muito.

À supervisora, mestre, grande pessoa e amiga, Ana Karla de Souza Abud, pela companhia, desejos, orientações e momentos de felicidade compartilhados. Aos projetos desenvolvidos, estágios convividos.

A minha co-orientadora, Profa. Renata Rosas, pelo incentivo e auxílio, e a todos os professores do PPGEQ, pelos ensinamentos e contribuições.

A todos que passaram pelo LEEQ (Laboratório de Ensino em Engenharia Química), LTBA (Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos) e LABSIA (Laboratório de Sistemas Inteligentes Aplicados), pelos experimentos compartilhados e amizades formadas, e ao PEC (Programa de Capacitação Discente), pelas alegrias, sucessos compartilhados e experiência adquirida. Em especial, Henrique, Francine e Andreza.

Aos meus amigos de cursos, 123-D (eterno), Técnico em Química Industrial, Tecnologia em Alimentos e Engenharia Química. Mesmo quando pensei em desistir, escutaram meus problemas e fizeram com que caminhássemos juntos. Em especial, na UFAL, à Letycia, Tammyres, Brígida, Morgana, Camila, Paula, Ruth, Anderson, Raul, Daniel, Jhonnys e, por fim, à Lívia M. O. Silva, pois faz exatamente 9 anos de convivência direta e de entendimento, amizade e ombro amigo, a única que esteve comigo do ensino médio, técnico em Química Industrial, curso de Tecnologia em Alimentos no IFAL e no LEEQ, do Centro de Tecnologia da UFAL.

À Georgia, Izabelle, Edna, Juliana, Delma, Paula e Francine, pela confiança das orientações e participações em suas bancas de estágio ou TCC.

Aos companheiros e irmãos do Mestrado em Engenharia Química 2014.1, Danilo, Amauri, Marcela, Rita, Daniel (Bahia), Raul, Tiago, Anderson, Lívia, Tarsila, Marcos, Thais, Luana, Luana Elida. À Coordenação do PPGEQ, que sempre ajudou a alcançar os meus objetivos e a concretizar esta etapa em minha vida.

RESUMO

A busca por outras fontes de energia tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas e a inovação na produção de biocombustíveis, a exemplo do etanol de segunda geração. A biomassa proveniente de resíduos agroindustriais apresenta como vantagens seu reaproveitamento, resolve o problema de descarte e, também, oferece um baixo custo de produção. Neste contexto, o presente trabalho avalia o melhor pré-tratamento (ácido, alcalino e hidrotérmico) de resíduos do processamento de frutas (laranja, maracujá e graviola) para a obtenção de bioetanol. Os resíduos coletados, armazenados em freezer a -20°C , foram descongelados à temperatura ambiente, sanitizados em hipoclorito de sódio 100 ppm por 15 min e secos em estufa de recirculação de ar a $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ até peso constante, sendo posteriormente triturados em um moinho de facas do tipo Willye a 30 mesh e acondicionados em frascos plásticos herméticos à temperatura ambiente. Foram realizadas determinações de lipídios, proteínas, umidade, cinzas, fibra, pectina e carboidratos totais. Os pré-tratamentos foram idealizados de acordo com delineamentos experimentais, sendo para o ácido, tempo de 15 a 120 min, $C_{\text{ácido}}$ de 1 a 5% e C_{biomassa} de 1 a 9%. Para o alcalino, utilizaram-se as mesmas condições do ácido, mudando apenas a C_{base} , de 0,5 a 2,5%. Para o hidrotérmico, somente os tempos e C_{biomassa} foram avaliados. Como respostas, o rendimento mássico, a quantidade de açúcares redutores totais (ART) e sólidos solúveis totais na fração líquida. Para a hidrólise enzimática, empregou-se celulase Sigma-Aldrich® na proporção 2:1, em mL enzima:g biomassa pré-tratada em 60 mL de tampão citrato 50 mM a 50°C e 100 rpm, avaliando-se a concentração de açúcares redutores totais. Na fermentação etanólica, empregou-se o hidrolisado, solução mineral e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como principais respostas a concentração de etanol e o rendimento da fermentação. Nos resíduos de laranja, graviola e maracujá as maiores sacarificações no licor do pré-tratamento ocorreram no ácido, utilizando-se menor concentração de biomassa e maior tempo de pré-tratamento (65%), ao passo que nas concentrações mais elevadas de ácido houve uma diminuição de açúcares, provavelmente porque sofreram degradação. No pré-tratamento alcalino, houve menor sacarificação que o ácido (35%) e menor rendimento mássico, indicando que algum componente da matriz lignocelulósica foi solubilizado, provavelmente a lignina, característica de tratamentos alcalinos. No hidrotérmico, houve a menor sacarificação tanto no licor do pré-tratamento quanto na hidrólise enzimática, possivelmente porque o tempo e temperatura usados não foram eficientes na destruição da matriz lignocelulósica. Na hidrólise enzimática,

o alcalino foi mais eficiente que o ácido, conseguindo-se, nas melhores condições, em torno de 35% de ART, à exceção do resíduo do maracujá (< 10% de hidrólise para os três pré-tratamentos), sugerindo relação negativa entre quantidade de pectina e ação das celulasas. O rendimento de fermentação se comportou de modo diverso entre os ensaios, obtendo-se para o pré-tratamento ácido com menor tempo (15 min) as maiores taxas, enquanto que para o alcalino e o hidrotérmico estas se situaram em um maior tempo (120 min) de pré-tratamento. Essas observações sugerem que, no caso do resíduo de graviola, as otimizações devem ser realizadas empregando menores tempos de aquecimento e maiores concentrações de biomassa. Entretanto, para o bagaço de laranja e resíduo de maracujá, a condição intermediária parece ser mais adequada, além de complexos enzimáticos mais eficientes e com a presença de enzimas que quebrem a pectina.

Palavras-chave: resíduos, etanol de segunda geração, frutas, pré-tratamento

ABSTRACT

The search for other sources of energy has encouraged the development of research and innovation in the production of biofuels, such as the second generation ethanol. Biomass from agricultural residues has advantages such as reuse, solves the disposal problem and also offers a low cost of production. In this context, this paper evaluates the best pretreatment (acid, alkaline and hydrothermal) waste from processing fruits (orange, passion fruit and soursop) to obtain bioethanol. The waste collected, stored at -20°C were thawed at room temperature, sanitized in 100 ppm sodium hypochlorite for 15 min and dried in an oven with air circulation at $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ until constant weight, ground and subsequently on a knife mill type Willye 30 mesh and packed in airtight plastic bottles at room temperature. Determinations of lipid, protein, moisture, ash, fiber, pectin and carbohydrate were performed. Pretreatments were designed according to experimental design where, for the acid, time 15 to 120 min, C_{acid} from 1 to 5% and C_{biomass} 1 to 9%. For the alkali, it was used the same conditions as the acid, changing only the C_{basis} , from 0.5 to 2.5%. For the hydrothermal only C_{biomass} and time were evaluated. As answers, the mass yield, the amount of total reducing sugars (TRS) and total soluble solids in the liquid fraction. For the enzymatic hydrolysis it was employed cellulase Sigma-Aldrich in a 2:1 by enzyme mL:g pretreated biomass in 60 mL of 50 mM citrate buffer at 50°C and 100 rpm, evaluating the concentration of total reducing sugars. In ethanol fermentation, was used the hydrolyzate complemented with mineral solution and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the main responses analyzed were ethanol concentration and yield of fermentation. The waste orange, passion fruit and soursop higher content of sugar in the liquor pretreatment occurred in the acid using low biomass concentration and longer pretreatment (65%), whereas at higher acid concentrations was sugars decreased, probably because undergo degradation. In alkaline pretreatment, was lower than the saccharification acid pretreatment (35%) and lower yields mass, indicating that some component of the lignocellulosic matrix was solubilized lignin probably characteristic of alkaline treatments. In hydrothermal there was the lowest saccharification liquor from both the pretreatment and in the enzymatic hydrolysis, possibly because the time and temperature used were not effective in destroying the lignocellulosic matrix. In enzymatic hydrolysis, alkali was more efficient than the acid, achieving, in the best conditions, around 35% of ART, except for the residue of passion fruit (<10% hydrolysis for the three pre-treatments), suggesting negative relationship between the amount of pectin and action of cellulases. The yield of fermentation behaved

differently among trials for obtaining pre-treatment acid with shorter (15 minutes) the highest rates, while for these alkaline and hydrothermal stood in a longer time (120 min) pretreatment. These observations suggest that in the case of residual soursop optimizations must be carried out using lower heating times and higher biomass concentrations. However, for the orange peel and passion fruit residue, the intermediate condition seems to be more appropriate, and more efficient enzyme complexes and the presence of enzymes that break down pectin.

Keywords: waste, second-generation ethanol, fruits, pretreatment

Lista de Figuras

Figura 1: Fontes de energia no mundo e Brasil.	21
Figura 2: Evolução dos preços dos combustíveis entre janeiro de 2003 e janeiro de 2013.	22
Figura 3: Produção anual de maracujá no Brasil.	27
Figura 4: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.	30
Figura 5: Cadeias dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina.	31
Figura 6: Estrutura química da cadeia de pectina.	32
Figura 7: Produção de etanol de 1ª e 2ª geração no mundo (em bilhões de litros/ano).	32
Figura 8: Fluxograma de obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.	33
Figura 9: Evolução da tecnologia enzimática no custo de produção do etanol celulósico.	35
Figura 10: Tipos de condução do processo de obtenção de etanol 2G.	36
Figura 11: Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da hemicelulose.	41
Figura 12: Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da celulose.	42
Figura 13: Esquema simplificado do procedimento experimental	47
Figura 14: Reação de redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico formando ácido aldônico.	48
Figura 15: Gráfico de Box para as variáveis estudadas.	58
Figura 16: Resultados obtidos no pré-tratamento ácido dos resíduos.	59
Figura 17: Aspecto visual do hidrolisado e resíduo após tratamento alcalino.	60
Figura 18: Resultados do pré-tratamento alcalino dos resíduos.	61
Figura 19: Resultados do pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos.	62
Figura 20: Hidrólise enzimática da biomassa oriunda do pré-tratamento ácido.	64
Figura 21: Hidrólise enzimática da biomassa oriunda de pré-tratamento alcalino.	65
Figura 22: Perfis de rendimento de fermentação dos hidrolisados.	68
Figura 23: Avaliação das condições limites do planejamento com bagaço de laranja.	70
Figura 24: Avaliação das condições limites do planejamento com resíduo de graviola.	72
Figura 25: Avaliação das condições limites do planejamento com resíduo de maracujá.	73
Figura 26: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com bagaço de laranja.	74
Figura 27: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com resíduo de graviola.	76
Figura 28: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com resíduo de maracujá.	78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativa do crescimento da demanda de etanol no Mundo, em bilhões de litros.	23
Tabela 2: Composição lignocelulósica dos resíduos do processamento de laranja, maracujá e graviola.	29
Tabela 3: Descrição dos objetivos e principais desafios da produção de etanol 2G.	34
Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos vários métodos de pré-tratamento.	37
Tabela 5: Efeito sobre a composição química e estrutura química/física da biomassa lignocelulósica em alguns dos principais pré-tratamentos.	38
Tabela 6: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise.	39
Tabela 7: Matriz do planejamento com repetições no ponto central para o pré-tratamento ácido.	49
Tabela 8: Matriz do planejamento com repetições no ponto central para o pré-tratamento alcalino.	50
Tabela 9: Matriz do planejamento para o pré-tratamento hidrotérmico.	50
Tabela 10: Caracterização físico-química do bagaço de laranja, do resíduo de graviola e da casca de maracujá desidratados e moídos.	57
Tabela 11: Dados da fermentação etanólica dos resíduos pré-tratados e hidrolisados enzimaticamente.	67
Tabela 12. Agrupamento dos dados experimentais dos resíduos nos diferentes pré-tratamentos.	71
Tabela 13: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com bagaço de laranja.	75
Tabela 14: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com resíduo de graviola.	77
Tabela 15: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com resíduo de maracujá.	79
Tabela 16: Viabilidade de uso do resíduo de graviola na produção de etanol.	81

Lista de Abreviaturas e Siglas

ART – açúcares redutores totais;

C – concentração, sendo os mais comuns são C_{biomassa} , C_{ART} e $C_{\text{ácido ou base}}$, expressas em g/L;

CBP – Sigla em inglês para bioprocesso consolidado;

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico;

FPU – Sigla em inglês que significa unidade em papel de filtro;

g – unidade de massa, e seus derivados (mg – miligrama, kg – quilograma etc.);

h – hora;

HMF – hidroximetilfurfural;

L - no texto pode significar liquefação (solubilização da biomassa sólida para o hidrolisado líquido) ou a unidade litro (L) e seus derivados (mL – mililitro); pode, ainda, no gráfico de Pareto e em seus fatores, indicar a relação linear (L);

m – massa, independente de qual massa signifique, por exemplo, m_{biomassa} , ou seja, a massa de biomassa utilizada;

mesh – granulometria em peneiras (numero de aberturas por polegadas linear);

min – minuto;

MS – na análise estatística $MS = (\text{erro padrão} - \text{Standard Error})^2$;

N – normal;

η_f – rendimento de fermentação, baseado na diferença de açúcares consumida no processo;

η_p – rendimento de processo, baseado na quantidade inicial de açúcares do processo;

M – molar, assim como seus derivados (mM – milimolar);

p – parâmetro estatístico do teste t de Student;

P_F – produtividade da fruta;

P_R – produtividade do resíduo;

P_{ms} – produtividade do resíduo em massa seca;

Q – no gráfico de Pareto significa iteração quadrática dos fatores analisados;

R_0 – Fator de severidade que leva em conta tempo e temperatura do pré-tratamento;

R^2 – coeficiente de regressão do modelo usado e o modelo calculado;

RM – rendimento mássico;

R\$ - reais;

SHF – Sigla em inglês para hidrólise e fermentação separadas;

SHCF – Sigla em inglês para hidrólise e co-fermentação separadas;

SSF – Sigla em inglês para sacarificação e fermentação simultâneas;

SSCF – Sigla em inglês para sacarificação e co-fermentação simultâneas;

SST – sólidos solúveis totais, nesse trabalho representado pela unidade ($^{\circ}\text{Brix}/m_{\text{biomassa}}$);

$t(3)$ – parâmetro estatístico da análise de variância, que significa coeficiente da variável/erro padrão da variável.

t – tonelada (1.000 kg);

U – umidade, expresso em numero de 0 – 1 ou em % de 0 a 100;

USD – dólares;

V – volume, geralmente dado em L e seus derivados, mL e etc.;

X_{ART} – conversão da biomassa em ART;

X_{ETANOL} – conversão em etanol a partir de açúcares, geralmente utilizado o dado teórico da equação de Gay-Lussac, que considera uma conversão em massa de 51,1%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Energia e etanol	20
3.2. A produção e o processamento de frutas no Brasil.....	23
3.2.1. Produção e processamento de laranja, maracujá e graviola	25
3.2.2. Produção e composição lignocelulósica dos resíduos	28
3.3. Etanol de segunda geração	29
3.3.1. Pré-tratamento da biomassa.....	36
3.3.2. Hidrólise enzimática	39
3.3.3. Fermentação etanólica.....	42
3.3.4. Produção de etanol 2G a partir de resíduos de frutas	43
3.4. Planejamento experimental e análise estatística	44
4. METODOLOGIA.....	47
4.1. Coleta, tratamento e caracterização bromatológica do resíduo	47
4.2. Estudos do pré-tratamento químico dos resíduos através de técnicas de planejamento experimental	49
4.2.1. Pré-tratamento	49
4.2.2. Hidrólise enzimática	51
4.2.3. Fermentação etanólica.....	53
4.3. Tratamento dos dados e avaliação das condições ótimas.....	54
4.4. Verificação da viabilidade para a produção de etanol 2G a partir dos resíduos.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Preparação do resíduo e caracterização bromatológica	57
5.2. Pré-tratamento	58
5.3. Hidrólise enzimática	63
5.4. Fermentação etanólica.....	66
5.5. Tratamento de dados	69
5.6. Cálculos de viabilidade de produção	81

5. CONCLUSÕES	83
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO I.....	96
ANEXO II	98
ANEXO III.....	100

1. INTRODUÇÃO

Toda a questão ambiental e a elevação dos custos do petróleo, ligados às necessidades estratégicas de produção de energia, têm motivado uma corrida à produção de combustíveis alternativos. Diante disso, o álcool etílico, ou etanol como é popularmente conhecido, aparece como uma alternativa para substituir os derivados do petróleo, contribuindo, também, para a diminuição das emissões de poluentes pelo fato do mesmo ser um biocombustível e, portanto, uma fonte renovável.

O etanol no Brasil é produzido, principalmente, a partir do processamento e fermentação da cana-de-açúcar, representando grande vantagem competitiva para a nação frente a outros países e colaborando para a manutenção de uma matriz energética mais limpa e renovável. Todavia, mesmo o país sendo detentor das tecnologias mais avançadas na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, ainda são necessários investimentos em tecnologias de geração e inovação de fontes de energia renováveis com base em biomassas lignocelulósicas para substituir uma parcela importante do consumo de derivados de petróleo (BNDES, 2008).

A conversão do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis para produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. Os resíduos agroindustriais lignocelulósicos são matérias-primas de grande interesse industrial, uma vez que podem ser utilizados para a produção de uma gama de produtos, não somente o etanol (NUNES et al., 2013).

O aumento populacional, o crescimento do consumo por frutas frescas e na forma de polpas, doces, sucos e néctares leva a uma elevação na quantidade de resíduos gerados, a nível industrial, compostos por sementes, cascas, restos de polpa, entre outros. As indústrias de processamento de polpa de frutas e sucos são geradoras de um grande volume de resíduos, que podem ser utilizados como biomassa celulósica para a produção de etanol de segunda geração. O aproveitamento de biomassa de frutas como fonte energética acarreta em uma melhoria da qualidade ambiental, impedindo que a mesma seja descartada indevidamente.

A produção de etanol de segunda geração se inicia com uma etapa muito importante, o pré-tratamento, onde a biomassa bruta passa por um tratamento ácido, alcalino ou hidrotérmico para, em seguida, ser submetida às etapas de hidrólise e fermentação. O principal papel do pré-tratamento é a alteração e/ou remoção da hemicelulose e/ou lignina da

biomassa, promovendo uma maior reatividade da fibra e diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose (MOISER et al., 2005).

Diante desse contexto e partindo de resíduos provenientes do processamento de polpas e sucos (laranja, maracujá e graviola), foi realizada a caracterização físico-química, estudos em diferentes condições de pré-tratamento ácido, alcalino e hidrotérmico, hidrólise enzimática e, posteriormente, determinação da capacidade da fermentação do material pré-tratado e hidrolisado para, com isso, analisar a sua viabilidade na produção teórica de bioetanol.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudo da viabilidade de produção de etanol a partir de biomassa residual do processamento das frutas laranja, maracujá e graviola.

2.2. Específicos

- Coleta, tratamento e caracterização físico-química dos resíduos;
- Estudos de pré-tratamento químico dos resíduos a partir de técnicas de planejamento experimental;
- Estudos de hidrólise enzimática na biomassa pré-tratada;
- Ensaio de fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Tratamento de dados e avaliação das condições ótimas;
- Estudos da produção teórica de etanol lignocelulósico no Brasil a partir desses resíduos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A crescente queima e escassez de derivados do petróleo, iniciada há 60 anos, têm gerado, juntamente com o desmatamento, o acúmulo na atmosfera de gases poluentes, particularmente de CO₂, responsáveis pelo efeito estufa e consequentes alterações climáticas (PEREIRA JR et al., 2008). Por isso, há uma necessidade de aumento das estratégias globais para a segurança energética e mitigação de energia relacionadas à emissão de CO₂, destacando-se o aumento da eficiência energética e a ampliação do uso de energia limpa, ou seja, uso de combustíveis que promovam o ciclo do carbono sem alterar o equilíbrio atmosférico (combustíveis renováveis) e o desenvolvimento dos recursos energéticos neutros em CO₂ (BRENNAN; OWENDE, 2010).

3.1. Energia e etanol

A matriz energética mundial é composta por cerca de 90% de fontes de carbono fóssil, sendo 33,09% de petróleo, 29,88% de carvão mineral e 23,93% de gás natural. A biomassa corresponde apenas a 10,1% da matriz energética mundial. O Brasil, visualmente dependente da hidroeletricidade e do petróleo (Figura 1), tem incentivado modestamente a produção de biocombustíveis. Apesar do uso de fontes renováveis de energia no Brasil ser dez vezes maior que a média mundial, ainda é considerada baixa (BP GLOBAL, 2011; EPE, 2013).

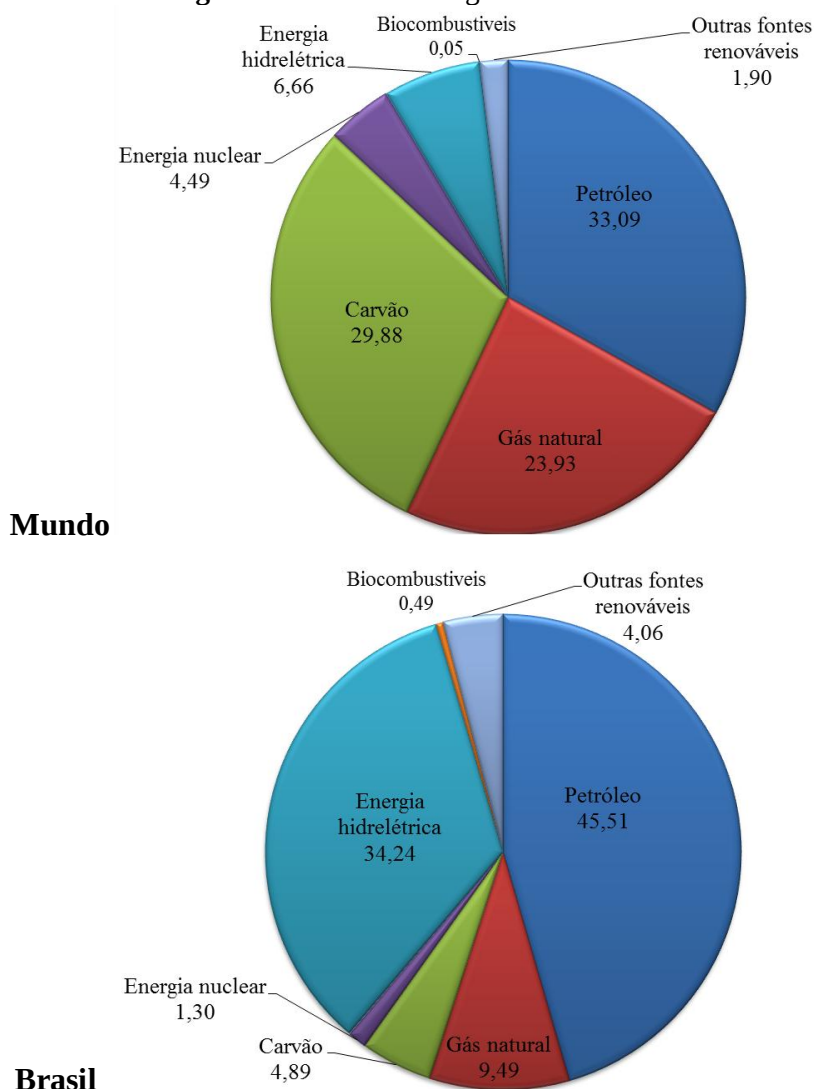
Os biocombustíveis assumem um papel importante na redução das mudanças climáticas mundiais e seu impacto dependerá de diversos aspectos relacionados à escolha de novas tecnologias, restrições legais, comércio internacional, uso da terra, escolha das matérias-primas e técnicas de gerenciamento (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007),

A produção de biocombustíveis no mundo a partir do século XXI cresce vigorosamente e os Estados Unidos, junto ao Brasil, representam cerca de 70% da produção mundial, contabilizados em Mtoe (*Millions Tonnes of Oil Content*) (SIMS et al., 2008).

Atualmente, a produção de biocombustíveis costuma ser classificada como primeira, segunda e terceira geração, diferenciando-se no processo e matéria-prima a ser utilizada. O bioetanol de primeira geração é aquele proveniente de alimentos ricos em açúcares solúveis ou a base de amido, possuindo como desvantagens o uso de grandes extensões de terra, produção limitada à estações do ano, necessidade do uso de adubos e agrotóxicos, redução da biodiversidade do solo, causando erosão e concorrência com a produção de alimentos. No entanto, possui uma tecnologia solidificada e baixos custos de produção. Para a segunda

geração, entende-se o emprego de materiais lignocelulósicos, os quais possuem como dificuldade a sacarificação, em função da lignina (composto recalcitrante não fermentescível e difícil de degradar biologicamente). Altas taxas de produção, associadas à pré-tratamentos violentos e uso de muitas enzimas específicas, promovendo uma baixa produtividade, faz com que este processo encontre muita dificuldade de consolidação em larga escala. Como terceira geração, estão as microalgas, as quais não possuem lignina em sua estrutura celular e geram altas taxas de crescimento quando comparadas às plantas superiores (JOHN et al., 2011, CHISTI, 2008, HARUN et al., 2011, HO et al., 2013).

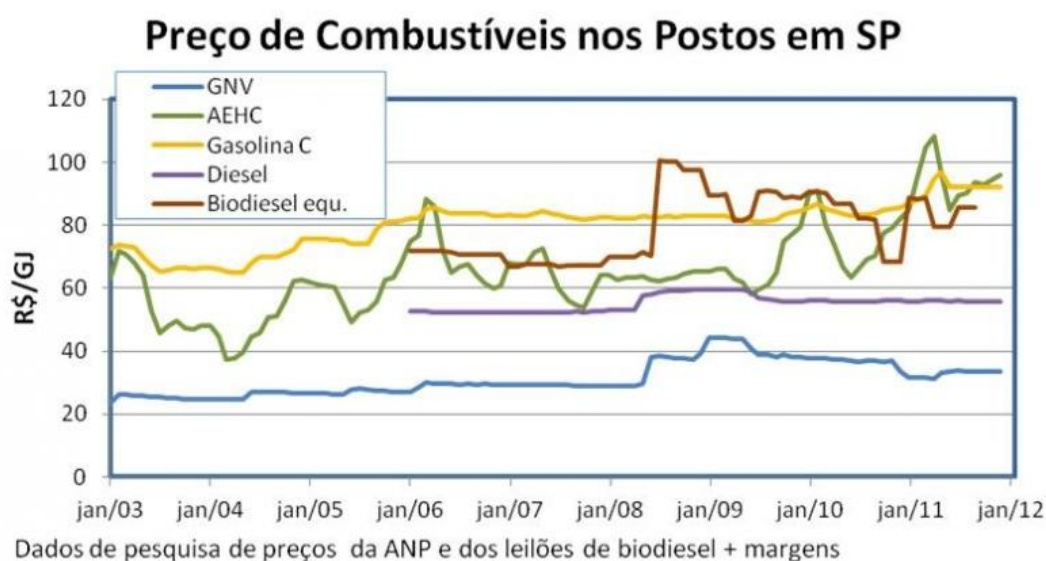
Figura 1: Fontes de energia no mundo e Brasil.



Fonte: Adaptado de BP GLOBAL, 2013; EPE, 2013.

Pode-se avaliar que a atratividade do bioetanol frente aos combustíveis convencionais é feita comparando o preço médio de venda ao consumidor. No caso dos veículos flexfuel, movidos a álcool e/ou gasolina, o bioetanol é adotado, em geral, até um limite de 70% do preço da gasolina (ANP, 2009). Assim, observa-se que, durante a maior parte dos últimos anos, utilizar o bioetanol em vez da gasolina foi mais interessante, exceto durante poucos e curtos períodos, quando seu preço se elevou ao final da safra, por problemas com chuvas, entre outros, como indicado na Figura 2 (IPT, 2012).

Figura 2: Evolução dos preços dos combustíveis entre janeiro de 2003 e janeiro de 2013.



GNV – Gás Natural Veicular; AEHC – Álcool etílico hidratado combustível, Gasolina C – Gasolina comum, Biodiesel equ – Biodiesel equivalente a petróleo.

Fonte: IPT, 2012.

Apesar de suas destacadas vantagens, a cana-de-açúcar, principal matéria-prima para a obtenção de bioetanol, não é uma opção viável para todas as regiões do planeta. Por esse motivo, os países do hemisfério norte vêm procurando incessantemente rotas tecnológicas que permitam a produção de um biocombustível eficiente, tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico (BNDES, 2008).

A Tabela 1 apresenta as estimativas de crescimento da demanda por etanol e exportações do setor, em bilhões de litros. Percebe-se que a tendência é aumentar continuamente a demanda por todos os tipos de etanol comercial, necessitando-se, em função disto, de uma complementação da produção, pois as rotas de etanol de primeira geração (materiais sacarinos e amiláceos como matéria-prima) já estão, de certa forma, saturados,

principalmente do ponto de vista de uso territorial, uma vez que competem com a produção de alimentos.

Tabela 1: Estimativa do crescimento da demanda de etanol no Mundo, em bilhões de litros.

APLICAÇÃO	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Hidratado (carro etanol)	3,9	3,5	3,0	2,6	2,2	1,7	1,3	0,9	0,4	-
Hidratado (carro flex)	15,6	19,1	22,8	26,7	30,9	35,2	39,7	44,4	49,4	54,7
Anidro (carro flex)	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,8	3,1	3,5	3,9	4,3
Anidro (carro gasolina)	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8	3,7	3,5	3,3
Industrial	1,2	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9
Exportações 5% a.a.	3,7	3,9	4,1	4,3	4,5	4,7	5,2	5,7	6,2	6,9
Exportações 10% a.a.	3,9	4,2	4,7	5,1	5,6	6,2	6,8	7,5	8,3	9,1
Exportações 15% a.a.	4,0	4,6	5,3	6,1	7,0	8,1	9,3	10,7	12,3	14,2

Fonte: MILANEZ et al., 2010

O aproveitamento de recursos naturais representa grande importância na atividade econômica de países em desenvolvimento, em especial nas atividades industrial e agrícola, com inúmeros estudos e investimentos em tecnologias limpas, economia de recursos, reciclagem e reaproveitamento de resíduos (UENOJO; PASTORE, 2007).

Apesar da evolução tecnológica em todas as cadeias da produção sucroenergética, faz-se necessário o uso de outras fontes de biomassa para complementar a produção de etanol. Essa demanda por outras fontes de energia tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas e a inovação na produção de etanol de segunda geração, usando a biomassa como matéria orgânica, principalmente resíduos, florestais ou da agroindústria (NUNES et al., 2013).

3.2. A produção e o processamento de frutas no Brasil

A flora brasileira é dotada de uma enorme diversidade de frutas, muitas delas com qualidade sensorial excepcional, despertando o interesse do mercado pelo apelo exótico e nutricional. Conhecer a composição dessas frutas tem sido alvo de pesquisas ao longo dos anos e é ponto fundamental para que o aproveitamento tecnológico das mesmas seja realizado de maneira otimizada (MATTIETTO et al., 2003).

O agronegócio é a principal força motriz da economia nacional, possuindo importantes avanços quantitativos e qualitativos, que o mantêm como setor de grande capacidade de

geração de empregos e renda. Seu desempenho médio supera a movimentação do setor industrial, ocupando, assim, uma posição de destaque no âmbito global, dando-lhe importância crescente no processo de desenvolvimento econômico por ser um setor dinâmico da economia e pela capacidade de alavancar os demais setores (COSTA, 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, representando cerca de 6% da produção mundial (ANDRIGUETO et al., 2013), estimada em mais de 41 milhões de toneladas. No entanto, menos de 1% da produção brasileira atual de frutas frescas é destinada ao exterior, principalmente nas vendas de produtos tropicais (LACERDA et al., 2004).

Em 2013, o cultivo de frutas no Brasil obteve melhor desempenho depois da crise de 2008, o que prevê para o final 2014 um pequeno avanço, mesmo distante de ser o mais adequado para quem trabalha com a exportação. Segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), reunidos pelo Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), as exportações em 2013 somaram 711,8 mil toneladas, sendo esse um crescimento de 2,7% em comparação aos números de 2012. Há alguns anos o país tem se consolidado como o maior exportador de polpas e sucos de frutas, dado o esforço dos produtores, juntamente com o governo. Quanto ao consumo interno, o desejo de uma melhor qualidade de vida e a disponibilidade cada vez maior em pontos de venda para uma melhor comercialização tem feito com que o cliente deixe de consumir refrigerantes e produtos industrializados em troca dos produtos mais saudáveis (MERCADO DO CACAU, 2013).

Para garantir a distribuição dos frutos a grandes distâncias e durante o período de entressafra, eles são processados em forma de sucos, polpas, geléias, entre outros. Isto se deve ao fato das frutas serem perecíveis, deteriorando-se em poucos dias, o que dificulta sua comercialização *in natura* por grandes distâncias. Com isso, a produção de polpas de frutas congeladas se tornou um meio favorável para o aproveitamento integral das frutas (BUENO et al., 2002). Uma das vantagens da industrialização de polpas e sucos das frutas é a possibilidade de consumo, em todo o país, de frutas provenientes de diversas regiões, algumas até mesmo cobiçadas no mercado externo (MORAES, 2006).

O apelo saudável dos produtos e a busca das pessoas por praticidade fez o consumo de sucos (em pó, prontos para beber, néctares e concentrado) no país sofrer, na última década, um aumento significativo, girando em torno de 21%, com destaque para os sucos prontos para beber e néctares, que cresceram cerca de 160% em sete anos (2002-2009). Os principais sabores consumidos foram laranja, pêra e maracujá, essa última muito difundida na região Nordeste e com elevado potencial de produção (ABIR, 2010).

Todo esse processamento das frutas gera resíduos que normalmente são utilizados como adubo ou ração animal. Todavia, com a crescente preocupação da sociedade em relação à preservação e conservação ambiental, procuram-se meios de implantação de produção agrícola e geração de energia alternativa e renovável mais sustentável. Vários processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para transformar os resíduos agroindustriais em produtos de valor econômico, agregando valor a um produto de descarte e possibilitando uma fonte de renda alternativa, cumprindo, assim, uma função ambiental e social, principalmente, mas também econômica (SILVA et al.; 2014).

3.2.1. Produção e processamento de laranja, maracujá e graviola

O Brasil é líder na produção mundial de laranjas, com aproximadamente 35% da produção mundial, estimada em 47.010 mil toneladas, sendo o mercado brasileiro de 18.101 mil t em 2010 (IBGE, 2012) seguido por EUA, China, Índia, México, Egito e Espanha. Estes 7 países produzem 68% de toda a laranja disponível e as utilizam de maneira diversa. No Brasil e nos Estados Unidos mais de 70% das laranjas produzidas são utilizadas pela indústria, principalmente na fabricação de sucos, enquanto no México e China, por exemplo, grande proporção das frutas são vendidas para consumo *in natura*. Na Espanha, mais de 50% das laranjas tem como principal destino a exportação. O rendimento da fruta é uma das principais características na produção de cítricos, pois determina a quantidade de sólidos solúveis necessária, ou mais adequada, ao uso pela agroindústria (CITRUSB, 2011). O Estado de São Paulo é responsável pela maior parte da produção nacional de laranja, com mais de 75%.

Na safra 2009/10, 86% de toda a laranja do Brasil foi utilizada pela indústria, sendo que 15% foram utilizadas na produção de NFC (suco concentrado) e 85% na produção de FCOJ (suco concentrado congelado). Comparada com a safra 1995/96, a proporção de frutas processadas cresceu 10%, confirmando a ótima capacidade da citricultura brasileira para a produção de frutas processadas (CITRUSBR, 2011).

A produção de maracujá possui grande importância para a economia brasileira, tendo como principais contribuições o emprego intensivo de mão-de-obra, a geração de renda e, principalmente, colheita contínua da safra ao longo de todo o ano. Seu cultivo pode ser realizado em vários estados brasileiros, tornando o Brasil o maior produtor mundial, havendo, ainda, uma enorme capacidade de ampliação. A maioria das pesquisas com maracujazeiros são direcionadas às plantas comerciais como *Passiflora edulis*, mas existem outras espécies de

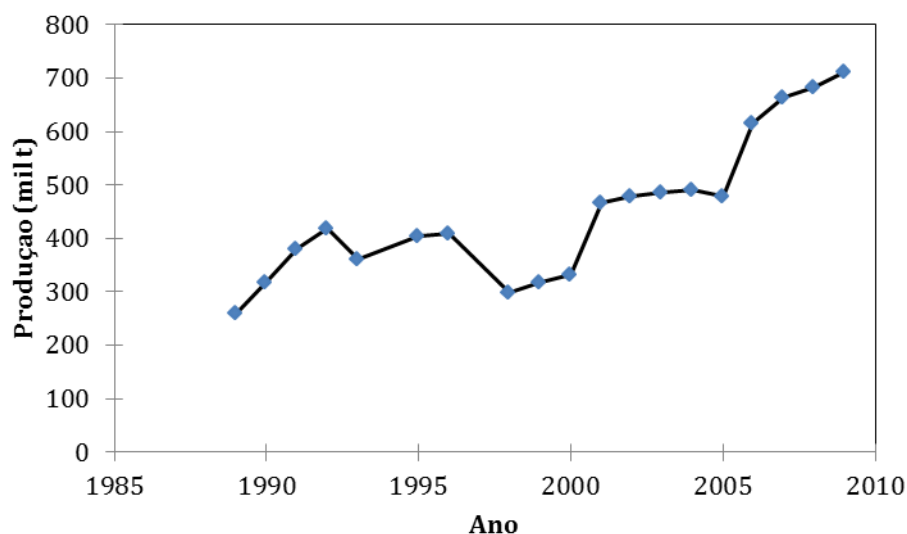
maracujazeiros silvestres com características importantes, as quais merecem atenção da comunidade científica (ARAÚJO, 2007).

No Brasil, o cultivo em escala comercial teve início por volta de 1970, com a espécie *P. edulis Sims.*, também conhecida como maracujá amarelo ou azedo. Essa cultura possui uma grande importância dentro do cenário agrícola brasileiro, com frutos de sabor bastante forte e elevados teores de acidez, que o tornam bastante interessantes tanto para o comércio *in natura* quanto para o processamento industrial (RUGGIERO, 1998).

Além de consumido *in natura*, o maracujá é utilizado na fabricação de suco pronto para beber, suco integral a 14° Brix e suco concentrado a 50° Brix, destinado à exportação. Outros produtos obtidos são a polpa, geléia e néctar. De acordo com Rossi (2001), a indústria não exige qualidade estética dos frutos para o processamento do suco. O °Brix, o rendimento de polpa e as perdas de linha (frutos verdes ou deteriorados) são as principais características necessárias para que seja viabilizado o processamento industrial. Para a agroindústria, o maracujá precisa ter a casca fina e cavidade interna completamente preenchida, o que lhe confere maior rendimento de suco. Deve apresentar, também, maior acidez, coloração constante e teor de sólidos solúveis acima de 12 °Brix. O Brasil também é o maior consumidor mundial, sendo que mais de 60% da produção doméstica se destina para o consumo *in natura* e o restante às indústrias de processamento de polpa e suco (MENEGOTO, 2008).

O Brasil produz 85% do maracujá consumido no mundo, sendo a terceira fruta mais consumida, perdendo apenas para a laranja e o caju (EMBRAPA 2012). No ano de 2010, a produção brasileira girou em torno de 920 mil toneladas (Figura 3), representando em torno de 70% do maracujá produzido mundialmente, com uma área plantada de 62 mil hectares, destacando-se os Estados da Bahia, com quase 45% da produção nacional, Ceará, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará e São Paulo, que juntos responderam a 86% da produção nacional, enquanto a região Sul ocupou o último lugar, com apenas 2% da produção brasileira da fruta (IBGE, 2012).

Outra fruta muito apreciada nos centros de distribuição é a graviola, importante nos mercados da América Tropical, sendo a Venezuela o maior produtor sul americano, com uma área plantada superior a mil hectares. No Brasil, apesar de sua importância comercial quando comparada a outras frutas, a produção é ainda pequena, mas sua demanda é crescente, assim como capacidade de aumento da produção, principalmente como forma de polpa. É bastante apreciada em países do Oriente Médio e da Europa, especialmente Alemanha e Espanha (CYSNE, 2004).

Figura 3: Produção anual de maracujá no Brasil.

Fonte: IBGE, 2012.

O cultivo comercial da gravioleira ainda é recente. Os frutos costumam ser destinados à agroindústria, visando à obtenção de polpa, suco, néctar, entre outros. Uma importante quantidade da produção é comercializada como fruta fresca (SÃO JOSÉ, 2003). A Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) estimou que a produção baiana de graviola, na safra de 2012, de 19 a 20 mil toneladas, com receita de R\$ 25 a 35 milhões, números bastante representativos para uma atividade recente e que começa a ganhar expressão nacional (LEMOS, 2014).

Além da Bahia, a graviola é amplamente cultivada em zonas de baixas altitudes nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, destacando-se os Estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Pará e Minas Gerais (LIMA, 2004). Por ser uma espécie originária do trópico úmido, a graviola tem boas possibilidades de crescimento na região amazônica (LEMOS, 2014).

Apesar da importância da graviola em algumas regiões do País, é reduzido o número de levantamentos sistemáticos de sua produção por parte de órgãos oficiais, o que dificulta uma análise mais atualizada e específica a respeito da evolução, comercialização e participação dessa fruta no agronegócio brasileiro (NOGUEIRA et al., 2005), principalmente quando se fala da comercialização do fruto descascado, que não passa pelas centrais de abastecimento, acreditando-se que a produção é bem superior que as 10.000 mil toneladas estimadas.

3.2.2. Produção e composição lignocelulósica dos resíduos

A indústria de suco de laranja produz como subproduto o bagaço ou polpa de laranja, que compreende aproximadamente 50% do total da fruta. O bagaço é obtido após a extração do suco da fruta após duas prensagens, o que restringe a umidade em torno de 65 a 75%, sendo depois submetida à secagem, da qual resulta até 90% de matéria seca para, então, ser peletizada e comercializada (TEIXEIRA, 2001). Considerando uma produção de 18 mil toneladas e que 85% foi processada, além do fato do rendimento de resíduo se situar em torno de 50%, pode-se estimar uma quantidade 7.650 mil toneladas por ano de bagaço de laranja que poderia ser aproveitado diretamente dos centros processados para produção de compostos de alto valor agregado.

Para o maracujá, cerca de 60% da produção doméstica é *in natura*, enquanto os outros 40% são processados em forma de polpas e sucos (MENEGOTO, 2008). Como a produção é em torno de 920 mil toneladas e cerca de 40% é destinada ao processamento industrial, além do rendimento médio da fruta se situar em torno de 35% (AMARO; MONTEIRO, 2001; OLIVEIRA et al., 2011), pode-se concluir que são geradas cerca de 240 mil toneladas de casca de maracujá, com mercado possuindo uma tendência altamente crescente.

Para a graviola, não se tem dados atualizados sobre a produção, estimando-se em 20 mil toneladas, com rendimento médio da casca e torta de filtro em torno de 35% (NAZARE, 2000), o que indica uma quantidade de resíduo gerado em torno de 7 mil ton/ano.

Um dos fatores a se considerar no uso desses resíduos para a produção de etanol de segunda geração, além da disponibilidade da biomassa, ou seja, volume de produção e logística, é a quantidade de material lignocelulósico presente nele, em massa seca.

A Tabela 2 apresenta dados sobre a composição lignocelulósica do bagaço de laranja, casca de maracujá e subprodutos do processamento da graviola. Percebe-se que os teores de lignina são baixos, à exceção dos dados fornecidos por Rogerio et al. (2011), mas elevado em celulose e hemicelulose, em torno de 50%, o que levam a ser associados à produção de bioetanol de segunda geração.

Tabela 2: Composição lignocelulósica dos resíduos do processamento de laranja, maracujá e graviola.

Resíduo	Hemicelulose*	Celulose*	Lignina*	Autor
Bagaço de laranja	16,19	27,85	8,79	Retore et al., 2010
Casca de maracujá	12,98	40,35	25,69	Rogerio et al., 2011
	9,95	41,67**		Souza et al., 2008
Subprodutos da graviola	13,30	21,00	12,90	Pereira et al., 2008
(casca e torta de filtro)	29,53	27,23**		Cysne, 2004

*% Em matéria seca. **Celulignina.

Fonte: Autor (2014).

3.3. Etanol de segunda geração

Denomina-se biomassa 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, 2010). Para a produção de etanol de primeira geração, as biomassas são provenientes de matérias-primas amiláceas e sacarinas, como o amido (EUA), cana-de-açúcar (Brasil) e a beterraba (União Européia), enquanto que as de segunda geração são provenientes de materiais lignocelulósicos, como palhas, bagaços, cascas, lenha, entre outros.

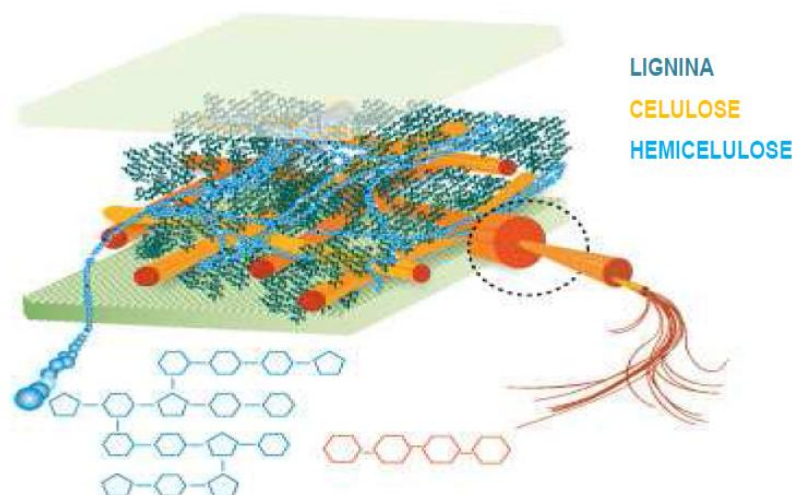
As tecnologias comercialmente disponíveis para a produção de bioetanol de primeira geração envolvem ganhos energéticos e ambientais bastante estreitos, com exceção da cana-de-açúcar. Essas biomassas apresentam ainda uma limitada vantagem econômica, pois encontram mercados optativos mais remuneradores, como no setor de alimentos ou como insumo para outras atividades. A cana-de-açúcar, mesmo com tantas vantagens, não é uma opção viável para todas as regiões do planeta. Os países do hemisfério norte, verificando a sua necessidade energética e não podendo desenvolver a cana-de-açúcar, estão procurando rotas tecnológicas que permitam a obtenção de algum biocombustível rentável econômica e ambientalmente (BNDES, 2008).

Apesar de se conhecer que desde o final do século XIX vêm sendo promovidas hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos, nas duas últimas décadas essa idéia tem sido proposta como alternativa de produção e complemento aos biocombustíveis. Os principais estudos e programas estão sendo desenvolvidos no hemisfério norte, principalmente nos Estados Unidos e Europa, em escalas experimentais, buscando torná-lo um eficiente biocombustível, capaz de ser produzido em quase todas as regiões do planeta. Além disso, todos os resíduos de biomassa possuem altos teores de material lignocelulósico,

sejam os produzidos pela agroindústria como pela indústria, assim como o lixo urbano (MACEDO et al., 2008).

De acordo com Lima et al. (2001), qualquer produto que tenha açúcar ou outro carboidrato se constitui em matéria-prima para a obtenção de etanol. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso considerar seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de obtenção. Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, os quais constituem cerca de 70% da massa seca, entremeados por outra macromolécula formada por alcoóis aromáticos, a lignina, que se encontra unida à celulose e à hemicelulose por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997), como ilustra a Figura 4.

Figura 4: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.

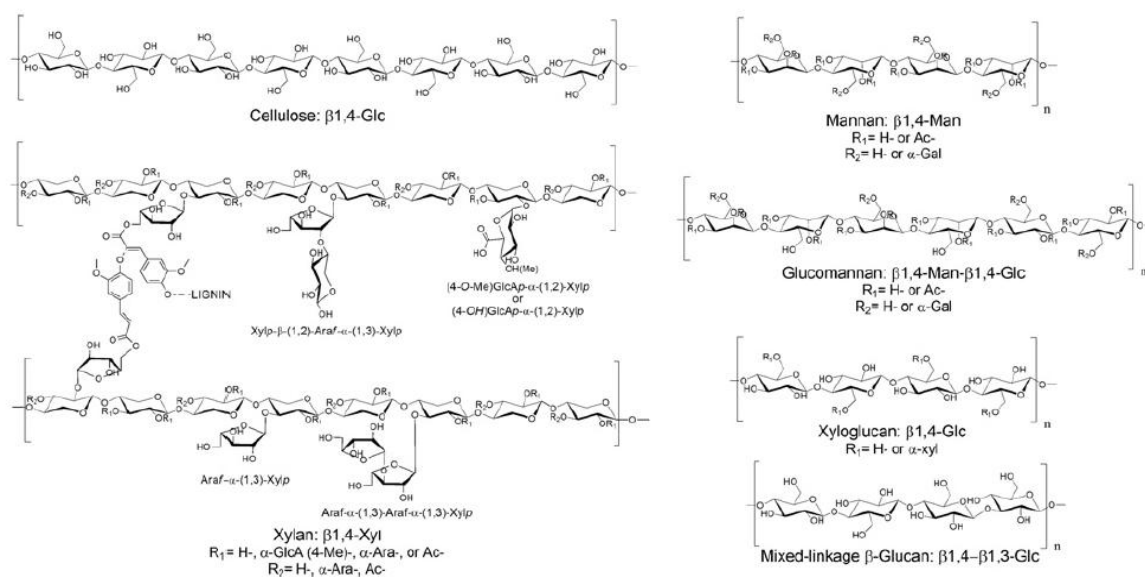


Fonte: BORTALAZZO, 2011.

A celulose é um polímero homogêneo composto por glicose (hexose) e a hemicelulose é um polímero heterogêneo constituído por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos como o acético. A xilose é o açúcar predominante na hemicelulose, podendo compreender de 20 a 40% do total de carboidratos dos subprodutos agrícolas. A lignina, por sua vez, é uma macromolécula polifenólica, de difícil degradabilidade, a qual grande parte de sua estrutura ainda é desconhecida. Todavia, sabe-se que seu efeito na hidrólise e fermentação são negativos, sendo sua retirada ou desagregação etapas importantes (TSAO, 2001; RODRIGHEZ-CHONG et al., 2004).

Na Figura 5 se visualiza o polímero de celulose unido por monossacarídeos de glicose, bem como os vários monossacarídeos presentes na hemicelulose e suas diversas associações. Há também, uma conexão da lignina presente entre duas polícadeias da hemicelulose.

Figura 5: Cadeias dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: JORDAN et al, 2012.

Os resíduos das agroindústrias processadoras de vegetais representam extraordinária fonte de materiais considerados estratégicos para algumas indústrias brasileiras, como é o caso da pectina, que até o presente momento tem sido isolada, com propósitos comerciais, a partir de cascas de laranja, limão, maracujá e maçã. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas com estas frutas, com intuito de aperfeiçoar os métodos de extração para aumentar o rendimento e a qualidade da pectina (KLIEMANN, 2006).

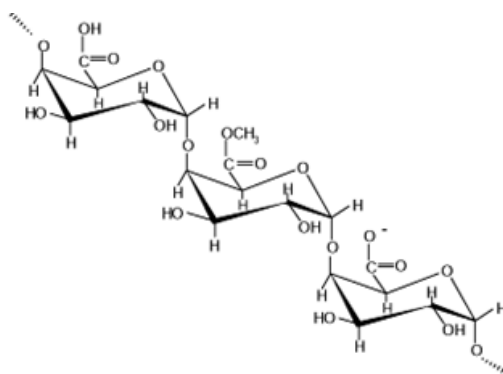
Dentre as fibras solúveis, a pectina caracteriza-se como o principal componente, sendo apontada como adjuvante na redução dos níveis de colesterol e glicemia, além de atividade anticancerígena e imunoestimulatória (MOHNEN, 2008; ANDERSON et al., 2009). A maior parte da pectina solúvel em água permanece no suco e a remanescente é insolúvel. Sua solubilização envolve processos físicos e químicos, sendo acompanhada por inevitável e não controlada remoção de açúcares neutros da cadeia lateral, bem como pela hidrólise de ligações ésteres (VORAGEN et al, 1995).

Resíduos de frutas, a exemplo dos de laranja, maracujá e maçã, possuem elevado teor de pectina (10 a 30%) e influenciam diretamente na hidrólise enzimática e obtenção dos açúcares a partir da matriz lignocelulósica, pois a pectina se localiza mais na parede celular primária dos vegetais, enquanto que a lignocelulósica está na parede secundária. São os maiores inconvenientes a um possível impedimento ao acesso de enzimas celulolíticas à matriz ou diminuição da ação destruturante da lignocelulose, causada pelo pré-tratamento

(GROHMANN et al., 1995; JORDAN et al., 2013).

Pectinas são biopolímeros formados quase inteiramente de ácido D-galacturônico (AGA) unidos por ligações glicosídicas α -(1-4) e resíduos de éster metil ácido galacturônico (Figura 6). Pectinas com grau de metoxilação acima de 50 %, chamadas de alta metoxilação, formam gel após aquecimento em soluções com concentração de açúcar superior a 55 % e pH abaixo de 3,5. Por outro lado, géis formados com pectina de baixa metoxilação (abaixo de 50 %) requerem a presença de íons cálcio, estendendo seu uso aos alimentos de baixa caloria como agentes geleificantes (IGLESIAS; LOZANO, 2004).

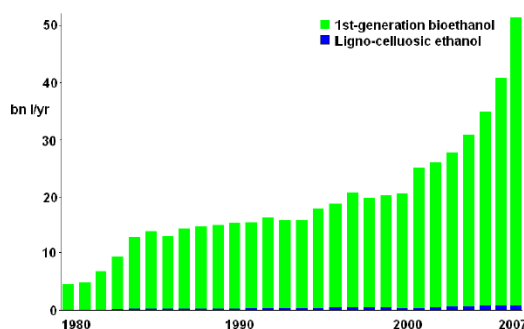
Figura 6: Estrutura química da cadeia de pectina.



Fonte: HOURDET; MULLER, 1991.

A demanda mundial por etanol alcançou, em 2007, mais de 50 bilhões de litros, superior ao dobro exigido em 2000. O etanol lignocelulósico vem crescendo modestamente e, com as atualizações de pesquisa e desempenho industrial, a tendência é aumentar o volume de produção, uma vez que quantidade e tipos de biomassas estão presentes em quase todas as regiões do planeta, sendo em grande parte representadas por resíduo. A Figura 7 mostra, ao longo das últimas décadas, o crescimento da demanda por etanol pelo mundo.

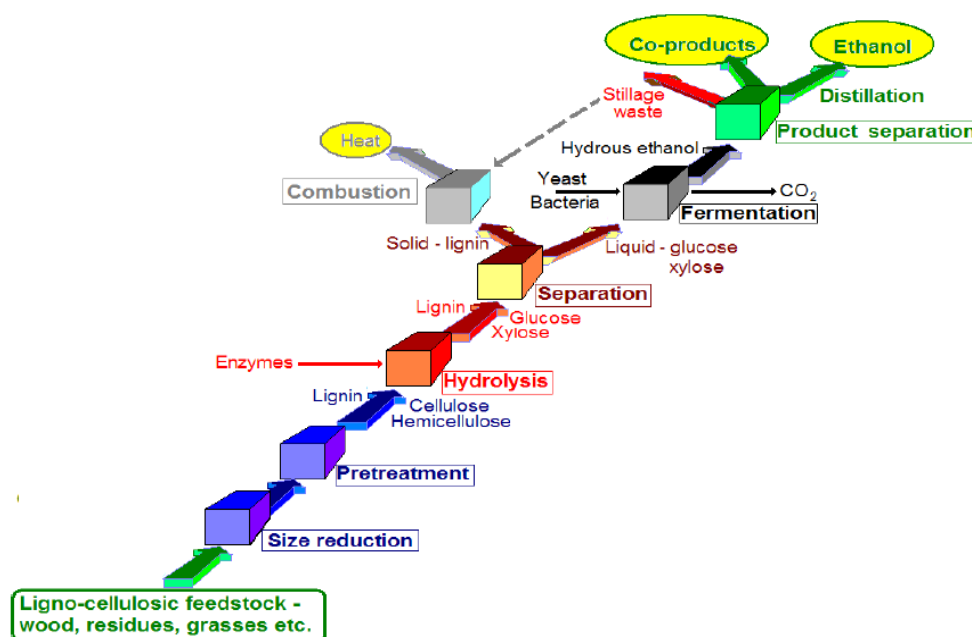
Figura 7: Produção de etanol de 1ª e 2ª geração no mundo (em bilhões de litros/ano).



Fonte : SIMS et al., 2008.

O fluxograma do processo para obtenção dos açúcares envolve, basicamente, a obtenção do material, pré-tratamentos, hidrólise enzimática, separação sólido-líquido, fermentação, destilação e obtenção do etanol comercial, além de alternativas energéticas paralelas que possuem a função de aumentar a sustentabilidade do processo, como obtenção de energia térmica e de co-produtos, como mostra a Figura 8.

Figura 8: Fluxograma de obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: SIMS et al, 2008.

As particularidades de cada etapa mencionada na Figura 8 podem ser visualizadas na Tabela 3, com os objetivos principais de cada etapa e seus desafios de pesquisa e desenvolvimento. Percebe-se que algumas etapas, como fermentação de hexoses e destilação, são bem consolidadas comercialmente, enquanto outras, a exemplo de utilização das pentoses e lignina, necessitam de muita pesquisa para consolidação de uma metodologia viável economicamente (SIMS et al., 2008).

É interessante ressaltar que o preço da enzima, nesta última década, decaiu bastante, o que refletiu também nos custos de produção, mesmo que de forma mais modesta, visto que depende de outras etapas. Contudo, necessita-se diminuir ainda mais para tornar o processo rentável, de forma a obter lucro líquido razoável. Novas formas de produção e formulações de complexos enzimáticos mais eficientes e em concentrações mais baixas devem ser o ponto

chave para a redução desse custo. A Figura 9 mostra as principais etapas de obtenção de etanol de segunda geração, seus objetivos e principais estágios atuais de desenvolvimento.

Tabela 3: Descrição dos objetivos e principais desafios da produção de etanol 2G.

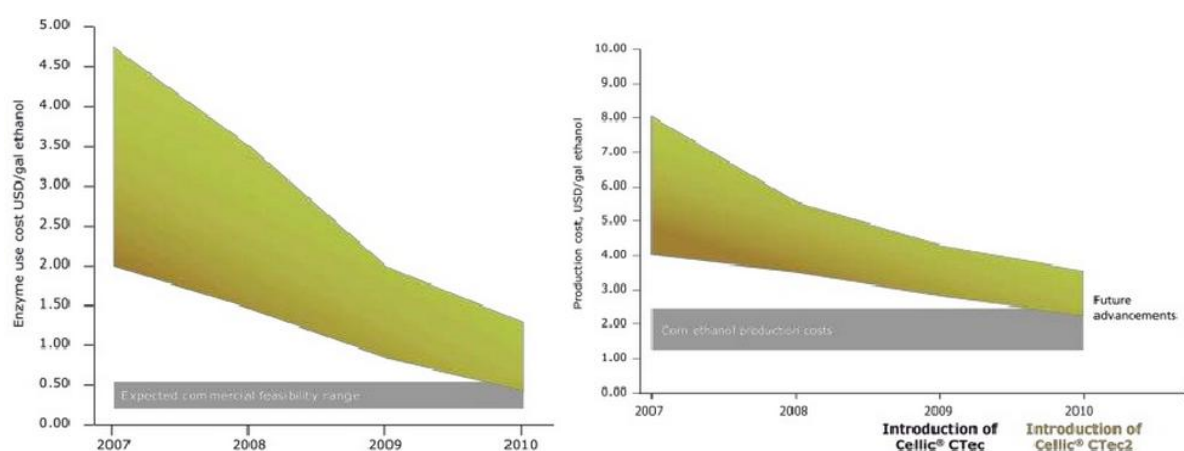
Sub-Processo	Objetivos	Estágio de desenvolvimento
Pré-tratamento	✓ Diminuição do diâmetro do material; ✓ Produção de densidade mássica ideal; ✓ Remoção de sujeiras e cinzas; ✓ Abertura da estrutura da fibra; ✓ Uso de despressurização rápida para explodir a fibra	Demonstração/comercial, mas necessita de otimização para os diferentes tipos de matéria-prima e processo de recuperação à jusante
Fracionamento	Ciclones para separar o sólido do vapor	Pesquisa e desenvolvimento
Produção de enzimas	Custo e taxa de processamento são fatores-chave	Comercial, mas necessita reduzir os custos para se chegar a 0,02 – 0,03 USD/litro de etanol
Hidrólise enzimática	✓ Produção de açúcares C₆ e C₅; ✓ Redução da viscosidade	Demonstração em breve
Fermentação de hexose	Levedura padrão	Comercial
Fermentação de pentose	✓ Levedura padrão não é adequada; ✓ Levedura e taxa de produção de um novo micro-organismo; ✓ Os efeitos da demanda da matéria-prima/unidade de produto e capital gasto em uma planta	Pesquisa/Plantas piloto se movendo para a comercialização
Recuperação de etanol	Destilação para obter 99,5% de etanol	Comercial
Recuperação da lignina e sua aplicação	✓ Separar lignina de outros sólidos; ✓ Combustão por calor e poder para produzir biomateriais e co-produtos	Pesquisa/Planta piloto – produção de co-produtos para verificar a performance econômica
Tratamento de efluentes	-	Pesquisa/comercial

Fonte: SIMS et al., 2008.

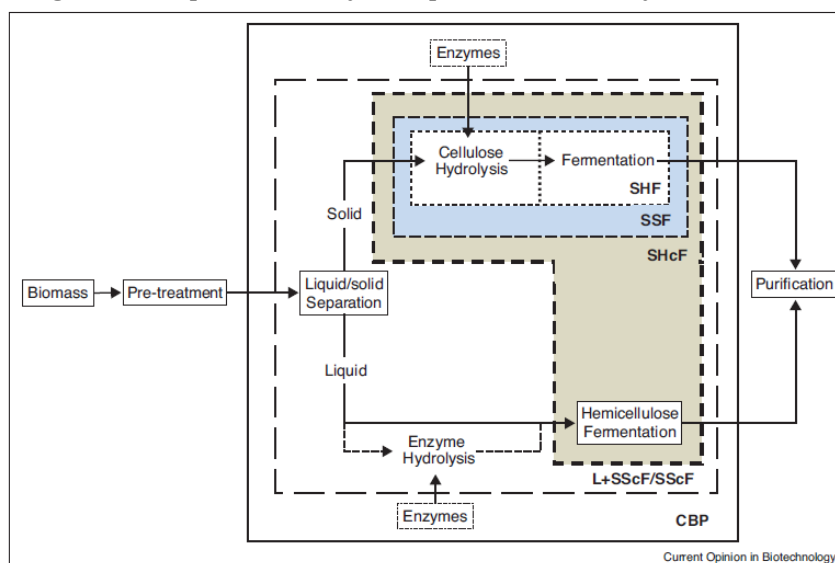
As conformações para produção de etanol lignocelulósico são diversas. No sistema SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*), a celulose é hidrolisada sozinha e, depois, fermentada, enquanto que no SHCF (*Separate Hydrolysis and Co-Fermentation*) há a fermentação em conjunto da hemicelulose hidrolisada anteriormente, sendo por isso chamada

de co-fermentação. A hidrólise da celulose pode ocorrer simultaneamente à fermentação, processo chamado de SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) ou com a presença da hemicelulose, chamada de SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*). Na liquefação seguida por simultânea sacarificação e co-fermentação (SSCF + L - *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation and Liquefaction*) há um passo de pré-hidrólise na presença de hemicelulose, seguido da fermentação, mas a hidrólise não cessa, ocorrendo com os dois processos até que se consiga hidrolisar e fermentar a maior porcentagem de açúcares em etanol (GEDDES et al., 2011). O bioprocesso consolidado (CBP – *Consolidated Bioprocessing*), envolve um biocatalisador capaz de produzir as enzimas hidrolíticas necessárias à hidrólise dos polímeros da biomassa, principalmente a celulose, além de ser capaz de fermentá-los em etanol, mesmo na presença de inibidores formados durante a hidrólise, provenientes de reações ou dos próprios polímeros e outros compostos presentes. Cada etapa e conformação do processo de produção de etanol lignocelulósico é ilustrado na Figura 10.

Figura 9: Evolução da tecnologia enzimática no custo de produção do etanol celulósico.



Fonte: Novozymes, 2014.

Figura 10: Tipos de condução do processo de obtenção de etanol 2G.

Fonte: GEDDES et al, 2011.

3.3.1. Pré-tratamento da biomassa

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode ser agrupado em quatro categorias: físico, químico, biológico ou uma combinação de todos esses, que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (CAPEK-MENARD et al., 1992). Um pré-tratamento ideal é aquele em que as fibras fornecem uma melhor reatividade, preserva-se a utilização da fração hemicelulósica e não se liberam compostos que inibam significativamente o processo (LYND, 1996).

Uma análise do pré-tratamento é feito 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: I) hidrólise enzimática do sólido insolúvel em água; II) fermentação da fração líquida para verificar se há a necessidade de uma diluição pela presença de inibidores do crescimento microbiano ; III) fermentação do hidrolisado obtido a partir do sólido insolúvel e IV) verificar a disponibilidade de se obter produtos de valor agregado das frações dos pré-tratados (AGBOR et al., 2011).

O pré-tratamento físico consiste em desbastar, cominuir e moer, visando à diminuição do diâmetro da partícula e, conseqüentemente, à cristalinidade da estrutura da parede dos vegetais, conseguindo, assim, uma maior superfície de contato. Os métodos químicos utilizam algum agente químico como catalisador, seja como um ácido ou uma base. Os físico-químicos

são uma associação entre um efeito químico e um físico, como a termólise ou explosão com amônia. Os pré-tratamentos biológicos ocorrem quando o material lignocelulósico é submetido ao tratamento com enzimas ou microrganismos, geralmente fungos (CORTEZ, 2010). Na Tabela 4 estão os pré-tratamentos atualmente estudados, suas vantagens e desvantagens. O pré-tratamento rompe a parede celular da planta e melhora o acesso enzimático para os polissacarídeos. Estudos têm mostrado uma correlação direta entre a remoção de lignina e de hemicelulose e a digestibilidade de celulose (KIM; HOLTZAPPLE, 2006).

Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos vários métodos de pré-tratamento.

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Ácido diluído	Barato e efetivo Remoção de hemicelulose	Formação de inibidores; Pouca lignina solubilizada; Requer reatores e componentes resistentes à corrosão
Ácido concentrado	Requer baixas temperaturas Alta taxa de hidrólise e, também, de degradação	Muito caro, altamente inviável do ponto de vista operacional e comercial
Alcalino - NaOH	Abertura dos poros do material	Problemas de corrosividade
Alcalino - CaO	Remoção de lignina	Formação de precipitados
Organossolv	Solubilizam a lignina	Recuperação dos solventes
Tratamento a vapor (Explosão a vapor)	Muito usado devido à simplicidade Parte da hemicelulose é solubilizada	Pode ser necessário o uso de ácidos e é necessária lavagem após o tratamento.
Explosão com amônia (AFEX)	Aumenta consideravelmente a digestibilidade; Poucos inibidores são formados	Praticamente nenhuma hemicelulose ou lignina é solubilizada; Significativo custo de capital devido à necessidade de reciclo e reuso da amônia
Hidrotermólise	Relativamente simples Parte da hemicelulose é solubilizada	Obtém na fração líquida oligômeros Necessidade de hemicelulase
Biológico	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização da celulose e hemicelulose	Lento Substrato será usado para crescimento

Obs. Nos casos em que se usa álcali ou ácido há ainda o inconveniente de neutralização da fração líquida.

Fonte : SZCZODRAK ; FIEDUREK., 1996, CORTEZ, 2010. SIMS et al, 2008 ; AGBOR et al, 2011.

Os processos mais utilizados são o ácido diluído, alcalino e hidrotérmico, devido, principalmente, à rentabilidade do processo. Dentre os ácidos mais usados está o ácido

sulfúrico diluído, que hidrolisa grande parte da fração hemicelulósica para o meio, o qual, dependendo das concentrações de ácido empregadas, também libera celulose, em maior ou menor grau, além de outros componentes, como a pectina e proteínas hidrossolúveis (CORTEZ, 2010).

Processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão) em comparação a sistemas ácidos. De acordo com Baudel (2006), o principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma (PITARELO, 2007).

O pré-tratamento hitotérmico utiliza apenas a água em contato com a biomassa, podendo ser também chamado de hidrotermólise, fracionamento aquoso ou aquoso/vapor, solvólise não-catalítica, aquasolvel ou auto-catalítico. Consiste, geralmente, no contato da água com a biomassa por 15 min a uma temperatura de 230°C, sendo cerca de 40 a 60% da biomassa total dissolvida no processo, com 4 a 22 % da celulose, 30 a 60% da lignina e toda a hemicelulose removida (MOISER et al., 2005). Na Tabela 5, pode-se verificar cada tipo de pré-tratamento utilizado no trabalho e suas principais diferenças quanto à modificação da estrutura lignocelulósica, tanto relacionado com a composição química como conformacional.

Tabela 5: Efeito sobre a composição química e estrutura química/física da biomassa lignocelulósica em alguns dos principais pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Área superfície acessível	Descristalização da celulose	Remoção da hemicelulose	Remoção da lignina	Alteração da estrutura da lignina
Ácido diluído	maior	não detectado	maior	não remove	maior
Base	maior	não detectado	menor	maior	maior
Hidrotérmico	maior	não detectado	maior	não remove	menor

Fonte: Adaptado de MOISER et al., 2005.

A severidade do processo aumenta com elevações na temperatura e no tempo de residência, além do aumento na concentração de catalisadores (ácido solvente ou base). Devido a isto, é necessário verificar o grau de severidade adequado a cada tipo de biomassa, pois uma condição muito elevada degradará frações indesejáveis, bem como formará compostos tóxicos (CORTEZ, 2010).

O grau de severidade do pré-tratamento foi descrito por Overend et al. (1987) e se trata de um fator relevante para saber o quão agressivo é o pré-tratamento empregado, através da relação temperatura e tempo de aquecimento. Em geral, seu cálculo é empregado a processos hidrotérmicos e organossolv. Segundo Heitz et al. (1991), o tratamento é considerado brando quando o grau de severidade estiver entre 0 e 3 e severo entre 4 e 6. A Equação 1 permite o cálculo deste parâmetro (R_0).

$$R_0 = \int_0^t e^{\left(\frac{T(t)-100}{14,75}\right)} dt \quad (1)$$

onde t é o tempo de aquecimento e T é a temperatura utilizada no pré-tratamento.

3.3.2. Hidrólise enzimática

Constitui-se hidrólise a quebra de uma ligação química com inclusão de uma molécula de água nas estruturas restantes, podendo ser química ou enzimática. Na hidrólise enzimática, como o nome cita, há a participação catalítica de uma ou várias enzimas.

Para obtenção dos açúcares fermentescíveis existem três tipos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, como indicado na Tabela 6: (I) hidrólise com ácido diluído, (II) hidrólise com ácido concentrado e (III) hidrólise enzimática. Com ácido concentrado, a hidrólise da hemicelulose e da celulose ocorre com ácidos fortes em baixas temperaturas, tendo como desvantagem o uso de equipamentos resistentes à corrosão, elevando o custo do produto final. A hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a celulose e os seus monossacarídeos ficam expostos ao meio reacional por muito tempo, provocando a perda desses açúcares (SZENGYEL, 2000).

Tabela 6: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise.

Processo	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento de glicose (%)
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215	3 min	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 h	90%
Enzimática	Celulase	50	1,5 dias	75-95%

Fonte: Adaptado de HAMELINK et al., 2005.

Com ácido diluído, a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada é removida após o primeiro passo da hidrólise e, no segundo passo, onde a celulose é hidrolisada, são empregadas altas temperaturas, quando açúcares e lignina solúvel são degradados, levando a uma inibição durante o processo de fermentação (SZENGYEL, 2000).

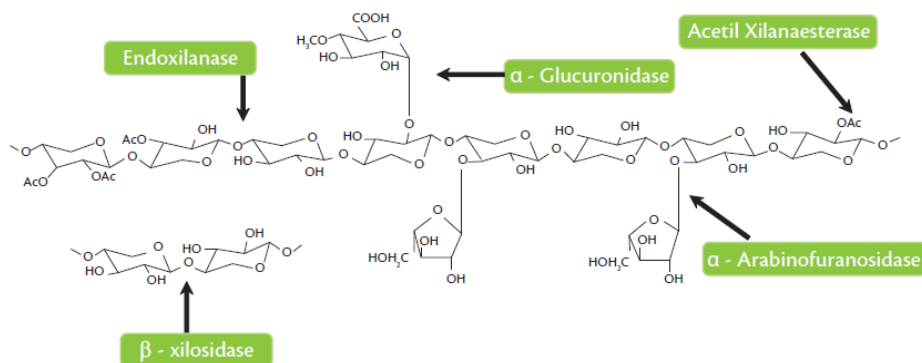
Na hidrólise enzimática, a conversão da celulose em glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulasas, que atuam rompendo as ligações glicosídicas das microfibrilas da celulose, resultando na liberação de glicose, a qual, posteriormente, passará pela etapa de fermentação e originará o etanol. As condições mais brandas aplicadas nesse tipo de processo levam a uma menor liberação de subprodutos e um consequente aumento do rendimento de açúcares fermentescíveis (DILLON, 2004).

O processo enzimático de conversão de celulose em glicose por meio das celulasas é o mais utilizado, devido aos bons rendimentos glicosídicos e ao desenvolvimento de tecnologias que podem tornar o processo viável, apesar da possibilidade de contaminação devido ao longo tempo envolvido na etapa de hidrólise, tornando a solução de açúcares formada e as próprias enzimas uma fonte disponível ao ataque de microrganismos indesejados (HAMELINK et al., 2005; CORTEZ, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é afetada pela concentração de substrato, pela atividade da enzima celulase e pelas condições da reação (temperatura, pH). À medida que o processo é otimizado, adquirindo mais conhecimento sobre as condições aplicadas e atividade das enzimas, pode-se elevar o rendimento do processo. Hemicelulasas, em pré-tratamentos que não as removem eficientemente, também são necessárias, pois restam ainda quantidades que podem atrapalhar o acesso das celulasas à celulose (SUN; CHENG, 2002).

As hemicelulasas são enzimas de alta complexidade e atuam quebrando cadeias poliméricas de hemicelulose. São produzidas em conjunto com as pectinases por fungos filamentosos como o *Aspergillus niger*. As hemicelulasas mais conhecidas são as xilanases e as β -glicanases (KOBELITZ, 2008). A Figura 11 mostra as principais enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose.

Figura 11: Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da hemicelulose.



Ac - grupo acetil

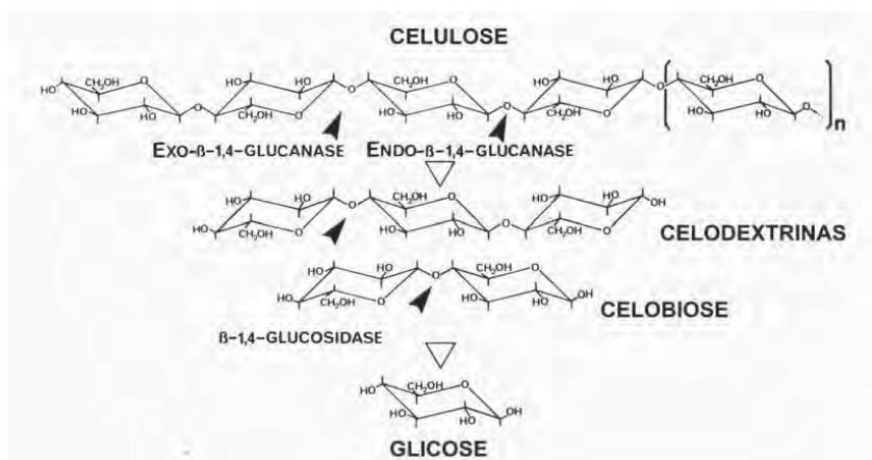
Fonte:CGEE (2010).

As celulasas são enzimas hidrolíticas capazes de catalisarem a hidrólise da ligação glicosídica. Uma boa hidrólise da celulose envolve um complexo celulolítico com diferentes especificidades e modos de ação (BOGAS, 2005). Essas enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 das cadeias de celulose, resultando em perda de massa e diminuição do grau de polimerização da celulose. Por meio da quebra das ligações glicosídicas são gerados monômeros de glicose com terminais redutores e não redutores.

As classes de celulasas mais conhecidas envolvidas no processo de degradação de celulose são endoglucanases, celobiohidrolases (ou exoglucanases) e β -glicosidases. A endoglucanase (Endo-1,4- β -D-glicanases - E. C. 3.2.1.4) age na celulose de forma desordenada, gerando oligossacarídeos. As celobiohidrolases ou exoglucanases (Exo-1,4- β -D-glicanases - E. C. 3.2.1.91) atuam sobre os oligossacarídeos ou partes terminais da celulose liberando celobiose e glicose. As β -glicosidases (E. C. 3.2.1.21) utilizam a celobiose e as converte em glicose (KOBLITZ, 2008). A Figura 12 mostra os sítios específicos de quebra para cada tipo de enzima e como a estrutura da celulose se torna em resíduos de glicose.

As celulasas são produzidas por microrganismos como bactérias anaeróbias do trato digestivo de ruminantes e de herbívoros e por fungos filamentosos do solo. Os principais microrganismos produtores são *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma viridae* (SILVA, 2009; CASTRO; PEREIRA Jr, 2010; AGUIAR; LUCENA, 2011).

Figura 12: Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da celulose.



Fonte: CGEE (2010).

3.3.3. Fermentação etanólica

A etapa seguinte à hidrólise é denominada fermentação. Esta, por sua vez, irá converter a glicose (açúcar) em álcool por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, já bastante utilizada como fermento industrial, apresentando bons desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica e aos inibidores do pré-tratamento e da fermentação. Todavia, *Saccharomyces cerevisiae* só fermenta hexoses, não sendo capaz de fermentar pentoses, sendo estes últimos os maiores constituintes da fração de hemicelulose. Já existem pesquisas em desenvolvimento de modificação genética da *Saccharomyces cerevisiae* para que esta possa fermentar, também, pentoses (SAHA et al., 2005).

Certas leveduras naturalmente ocorrentes, a exemplo da *Pichia stipitis* (aka *Scheffersomyces stipitis*), *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são capazes de fermentar xilose a etanol, sendo as taxas de produção mais reduzidas quando comparadas as da fermentação etanólica de glicose (CGEE, 2010).

Visando a integração desses dois processos, pesquisas tem sido desenvolvidas basicamente com duas abordagens. Na primeira, busca-se a construção de um microrganismo recombinante, com adicional habilidade de processar a via das pentose-fosfato. A segunda abordagem visa aumentar os rendimentos em etanol através da engenharia genética em microrganismos que já possuem a habilidade de fermentar tanto hexoses quanto pentoses (CGEE, 2010).

3.3.4. Produção de etanol 2G a partir de resíduos de frutas

Dentre os resíduos de frutas com estudos sobre produção de bioetanol, destaca-se na literatura os da laranja, devido à importância mundial de seu consumo e ter a maioria dos requisitos para ampliação de escala, como volume de produção. As pesquisas tentam otimizar os custos de produção e melhorar a tecnologia industrial.

Segundo Yamanaka (2005), os resíduos cítricos representam cerca de 50% do peso total dos frutos e cerca de 80% é industrializado para produção de suco concentrado ou congelado, ou seja, se no Brasil atualmente há uma produção estimada de 25 milhões de toneladas por ano, segundo o IBGE (2012), pode-se estimar uma produção de resíduos cítricos de 10 milhões de toneladas por ano.

Como consequência da alta produção, há uma significativa geração de subprodutos, compostos de cascas, sementes e polpas, que equivalem a 50% do peso da fruta, com uma umidade próxima a 82%, tendo como principal destino a complementação para ração animal (REZZADORI; BENEDETTI, 2009). Todavia, em função do alto conteúdo de água, possibilitando a degradação microbiana, geração de mau cheiro e contaminação do solo, pesquisas vem sendo realizadas na busca de novas alternativas de emprego destes resíduos.

Lennartsson et al. (2012) citam que as cascas de frutas cítricas são ricas em pectina, celulose e hemicelulose, podendo ser empregadas como substrato de baixo custo na produção de etanol de segunda geração, ao mesmo tempo em que se reduzem os problemas com a sua disposição. Rezzadori; Benedetti (2009) citados por Marinelli et al. (2012) apresentam que a casca da laranja contém 16,9% de açúcares solúveis e, como polissacarídeos insolúveis da parede celular, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina, comprovando grande potencial de transformação desta biomassa em produtos de alto valor agregado, obtidos através da hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica.

Ylittervo (2008) utilizou cascas de laranjas secas pra produção de etanol utilizando o fungo *Mucor indicus*, hidrolisando-as por dois métodos diferentes de açúcares fermentescíveis: (I) por hidrolise com ácido diluído 0,5% (v/v) de H₂SO₄ a 150°C e (II) por hidrólise enzimática utilizando celulase, pectinase e β -glicosidase. Quando cultivada em hidrolisados ácidos, obteve-se um rendimento de 0,36 g/g após 24 h, enquanto no cultivo enzimático a casca de laranja gerou um rendimento máximo de etanol de 0,33 g/g após 26 h. Além de etanol, o glicerol foi o único componente produzido em quantidades significativas, detectando-se, assim, grande poder de bioconversão da biomassa estudada.

Widmen et al. (2010) investigaram as variáveis tempo, temperatura e pH nos pré-

tratamentos dos resíduos de processamento de laranja. A solubilização das hemiceluloses foi satisfatória para todos os pré-tratamentos a 160°C, utilizando uma purga a vapor com 70% da pectina solubilizada com resíduo natural em comparação com mais de 80% do resíduo pré-tratado com ácido (pH 2,8). Em contra-partida, com os resíduos de pré-tratamentos alcalinos (pH 6,8), a pectina foi rapidamente destruída. Foram analisadas, também, variáveis como temperatura (120, 140 e 160°C) e tempo (2, 4, 6, 8 e 10 min), usando o resíduo natural, tratado com ácido (H_3PO_4 ou H_2SO_4 a 10%) e com base (carbonato de sódio em pó), sendo utilizado nessa etapa um reator pré-aquecido. O teor de açúcar após a hidrólise enzimática em 48 horas de sacarificação e fermentação simultâneas variou de 76 a 94%.

Lohrasbi et al. (2010) desenvolveram um projeto de processos e análise econômica de uma biorrefinaria para o tratamento de resíduos cítricos. O resíduo foi hidrolisado com ácido sulfúrico diluído e, em seguida, processado pra produzir limoneno, etanol e biogás. O custo total do etanol para o processo, com base na produção de 100.000 toneladas de resíduos de citros por ano, foi de 0,91 USD/L, assumindo manuseio de 10 USD/ton como custo de transporte de resíduo para a planta. No entanto, o preço é sensível à capacidade da planta e, com preço constante de metano e limoneno e alterando a capacidade da planta de 25.000 para 400.000 toneladas, pode-se trazer redução nos custos para 2,55 a 0,46 USD/L, tornando o processo economicamente viável. O processo é composto por hidrólise com ácido diluído, fermentação, recuperação de etanol, digestão anaeróbia e tratamento de águas residuais. Este estudo mostrou a possibilidade de etanol economicamente viável através de um processo não enzimático, bem como o fato de uma temperatura moderada para hidrólise contribuir na redução dos custos operacionais.

3.4. Planejamento experimental e análise estatística

O planejamento experimental possui a função de obter resultados significativos a partir de uma quantidade reduzida de experimentos, gerando, com isto, menos sobreposições e ganhando tempo analítico. São muitos os tipos de planejamento, destacando-se o tratamento em pares, o tratamento em blocos, o quadrado latino, o quadrado greco-latino, o quadrado hiper-greco-latino e os planejamentos fatoriais (RODRIGUES; IEMMA, 2007).

Nestes planejamentos, é importante delimitar os conceitos de fatores, resposta, efeito principal e efeito de interação. Os fatores são as variáveis que se deseja verificar a influência dentro de um determinado processo, ou seja, as variáveis independentes impostas nos ensaios.

As respostas são as variáveis analisadas após o processo e são, portanto, consideradas dependentes. A partir de uma combinação dos fatores é possível modular a superfície da variável resposta analisada. O efeito principal é a diferença da média observada na resposta quando o fator investigado é alterado. O efeito de interação é a diferença da média observada para a resposta quando dos fatores são combinados, ou seja, dois efeitos principais; influenciando indiretamente por associação entre os fatores.

O planejamento fatorial é indicado para a fase inicial do procedimento experimental, pela necessidade delimitar os fatores importantes e conduzir a ensaios mais detalhados e realmente significativos, estudando-se seus efeitos sobre a variável resposta analisada (BUTTON, 2001). A indicação N^k representa o numero de ensaios totais que são necessários, onde N representa o número de níveis estudados dentro de um intervalo, geralmente representados como -1, 0 e +1, sendo o 0 o ponto central do intervalo formado pelos pontos -1 e +1, e k o número de fatores analisados. Assim, quando se deseja estudar dois níveis (-1 e +1) e 3 fatores (variáveis) serão necessários conduzir 2^3 ensaios, totalizando-se 8 experimentos.

Considerando a utilização de 3 fatores, o modelo estatístico pode ser representado na forma geral, quando os efeitos significativos são lineares ou quadráticos, conforme a Equação 2, também levando em conta a média observada nos ensaios (M), os coeficientes de regressão e o erro associado, utilizados para a confecção da superfície de resposta.

$$Y = M + Ax_1 + Bx_2 + Cx_3 + ABx_1x_2 + BCx_2x_3 + ACx_1x_3 + A_ix_1^2 \quad (2)$$

onde:

Y = variável resposta analisada

M = média geral dos ensaios realizados

A, B e C = coeficientes de regressão dos efeitos principais dos fatores x_1, x_2 e x_3 , respectivamente

A_i = coeficientes de regressão do efeito quadrático do fator x_1

AB, BC, AC = coeficientes de regressão dos efeitos de interação x_1, x_2 e x_3

Uma ferramenta estatística e matemática poderosa para as técnicas de otimização, comumente utilizada em engenharia, é a metodologia de superfície de resposta (RSM – *Response Surface Methodology*), devido a sua teoria abrangente, alta eficiência e simplicidade. Engloba um grupo de técnicas utilizadas para estudar a relação entre uma ou

mais respostas medidas e variáveis de entrada, podendo ser utilizada em problemas que têm ingredientes e/ou condições de processamento como variáveis (ARTEAGA et al., 1994). A correlação entre as variáveis poderão ser lineares ou quadráticas, a depender das respostas obtidas.

Outras representações, como gráficos de Pareto e diagramas causa e efeito, costumam ser utilizadas, todas baseadas em determinar o efeito dos fatores sobre as respostas.

4. METODOLOGIA

A metodologia consistiu, inicialmente, na seleção do resíduo, sendo sua coleta feita na unidade produtora de beneficiamento, seguida de secagem e moagem para facilitar a conservação da matéria-prima, passando-se a sua caracterização bromatológica e posterior pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, conforme detalhado a seguir e ilustrado na Figura 13.

Figura 13. Esquema simplificado do procedimento experimental



Fonte: Autor, 2014.

4.1. Coleta, tratamento e caracterização bromatológica do resíduo

Os resíduos, após a extração do suco/polpa na unidade produtora (maracujá e graviola – COOPEAGRO – Maragogi – AL e laranja – COOPLAL – Santana do Mundaú – AL), foram coletados e levados ao laboratório onde ocorreu a sanitização com hipoclorito de sódio a 100 ppm por 15 min. Em seguida, foram colocados em estufa de circulação forçada de ar a 55±5°C até peso constante, com velocidade do ar de 2 m/s, sendo posteriormente triturado em moinho de facas tipo Wylle com peneira de 30 mesh e acondicionados em frascos plásticos herméticos à temperatura ambiente.

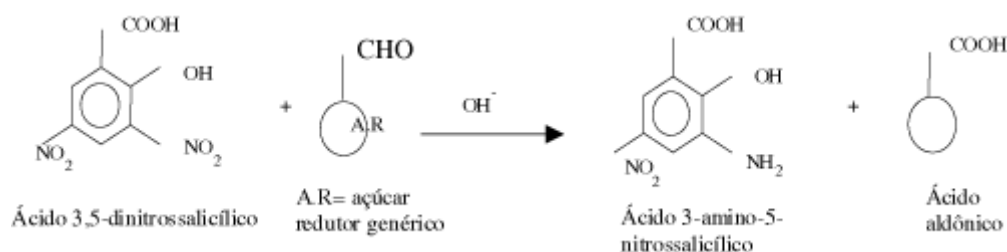
Foram realizadas análises dos teores de umidade, cinzas proteínas, lipídeos, fibras e açúcares. Para umidade, resíduo mineral fixo (cinzas), lipídeos e proteína bruta, seguiram-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e AOAC (2002). O teor de umidade

foi baseado na determinação da perda de peso do produto submetido ao aquecimento a 105°C, até peso constante. O teor de cinzas ou resíduo mineral fixo corresponde ao resíduo obtido por incineração em temperaturas de 550°C até a obtenção de cinzas claras. A determinação de lipídeos totais foi realizada a partir de extração direta em Soxhlet, tendo hexano como solvente de extração. A determinação de proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, tendo 6,25 como fator para o nitrogênio protéico. O teor de fibra bruta foi determinado pelo método proposto por Hennenberg (1864) citado por Giger-Reverdin (1995), no qual a amostra sofre digestão em meio ácido seguido por outra em meio alcalino, sendo o material sólido restante quantificado como fibra bruta. A percentagem total de carboidrato foi feita por diferença das análises supracitadas.

Para a determinação de pectina, utilizou-se o método proposto por Carvalho et al. (2002), no qual a amostra convenientemente triturada é fervida em solução levemente ácida, onde é solubilizada a quantidade de pectina presente da amostra, com posterior precipitação com cloreto de cálcio, filtração, secagem e pesagem.

Para a determinação de açúcares redutores totais (ART) foi utilizado o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), descrito segundo Miller (1959). A determinação de açúcares redutores pelo método do DNS se baseia na redução, em meio alcalino, do ácido 3,5-dinitrossalicílico (coloração amarela). O produto formado é estável, com coloração laranja-avermelhado (3-amino-5-nitrossalicílico) na proporção estequiométrica e máxima absorção da luz visível no comprimento de onda de 540 nm (RODRIGUES; SANTOS, 2011). Neste método ocorre a reação de oxidação ilustrada na Figura 14.

Figura 14: Reação de redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico formando ácido aldônico.



Fonte: Silva et al., 2003

4.2. Estudos do pré-tratamento químico dos resíduos através de técnicas de planejamento experimental

Utilizou-se o estudo de 3 variáveis (tempo de aquecimento, concentração de ácido ou base e concentração de biomassa) em um planejamento com 3 níveis (-1, 0 e +1). As respostas utilizadas consistiram nas determinações de % ART, % Rendimento mássico (RM) e de sólidos solúveis totais (SST) ($^{\circ}\text{Brix}/m_{\text{biomassa}}$).

4.2.1. Pré-tratamento

Avaliaram-se pré-tratamentos ácido, alcalino e hidrotérmico, conduzidos em autoclave a 121°C e 1 atm, calculando-se o grau de severidade de cada ensaio nos tempos de aquecimento utilizados. Como o número de variáveis possível de ser explorado em todas as etapas era bastante significativo, o emprego de planejamento experimental exploratório de Taguchi e semifatorial a dois níveis (Box e Draper, 1987) pode permitir avaliar a importância e o efeito linear das mesmas. A escolha do tipo apropriado de planejamento depende do número de variáveis, com a limitação da carga experimental exigida. Desta forma, foi possível executar um planejamento fracionado sem que fosse necessária a determinação de todos os parâmetros do processo, utilizando o Software STATISTICA®.

O pré-tratamento ácido foi feito com ácido sulfúrico diluído (1 a 5%), onde se verificou 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 no licor. As variáveis de interesse foram concentração de ácido sulfúrico (1, 3 e 5 mL ácido/100 mL), a concentração biomassa (1, 5 e 9 g resíduo/100 mL de solução ácida) e tempo de aquecimento (15, 67,5 e 120 min), organizado num planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, como detalha a Tabela 7.

Tabela 7: Matriz do planejamento com repetições no ponto central para o pré-tratamento ácido.

Fator/Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tempo (min)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	0 (67,5)	0 (67,5)	0 (67,5)
C ácido (mL/100 mL)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
C biomassa (g/100 mL)	-1 (1)	-1 (1)	1 (9)	1 (9)	-1 (1)	-1 (1)	1 (9)	1 (9)	0 (5)	0 (5)	0 (5)

Fonte: Autor (2014)

No pré-tratamento alcalino, avaliou-se a melhor eficiência do NaOH em relação à desassimilação de açúcares redutores, rendimento mássico e teor de sólidos solúveis por grama de biomassa pré-tratada liberada no licor, tendo como variáveis de interesse a concentração de hidróxido de sódio (0,5, 1,5 e 2,5 mL NaOH/100 mL), a concentração biomassa (1, 5 e 9 g resíduo/100 mL de solução básica) e o tempo de aquecimento (15, 67,5 e 120 min), organizado num planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Matriz do planejamento com repetições no ponto central para o pré-tratamento alcalino.

Fator/Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tempo (min)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	-1 (15)	1 (120)	0 (67,5)	0 (67,5)	0 (67,5)
C base (mL/100mL)	-1 (0,5)	-1 (0,5)	-1 (0,5)	-1 (0,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	0 (1,5)	0 (1,5)	0 (1,5)
C biomassa (g/100 mL)	-1 (1)	-1 (1)	1 (9)	1 (9)	-1 (1)	-1 (1)	1 (9)	1 (9)	0 (5)	0 (5)	0 (5)

Fonte: Autor (2014).

No pré-tratamento hidrotérmico, investigou-se apenas a concentração biomassa (1, 5 e 9 g resíduo/100 mL de água) e o tempo de aquecimento (15, 67,5 e 120 min), avaliando as mesmas variáveis dos pré-tratamentos anteriores, sendo organizado num planejamento experimental 3^2 completo, com 9 ensaios, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Matriz do planejamento para o pré-tratamento hidrotérmico.

Fator/Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tempo (min)	-1 (15)	-1 (15)	-1 (15)	0 (67,5)	0 (67,5)	0 (67,5)	+1 (120)	+1 (120)	+1 (120)
C biomassa (g/100 mL)	-1 (1)	0 (5)	+1 (9)	-1 (1)	0 (5)	+1 (9)	-1 (1)	0 (5)	+1 (9)

Fonte: Autor (2014).

Após o processo de pré-tratamento toda a suspensão foi filtrada sendo divididas em fração líquida e fração sólida. A fração sólida, conceituada como rendimento mássico (%RM) pode ser obtida através da Equação 3.

$$\%RM = \frac{m_{final}}{m_{amostra}} \quad (3)$$

A determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix) foi feita através de refratômetro digital portátil, marca HANNA HI 96801, com compensação automática de temperatura e faixa de medição 0 a 85° Brix. Para determinação dos solúveis totais, em base de massa, usou-se a Equação 4.

$$SST = \frac{^{\circ}Brix}{m_{amostra}} \quad (4)$$

Na determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi coletado 1 mL da solução obtida no pré-tratamento ou hidrólise enzimática, sendo esta amostra hidrolisada com 4 mL de H₂SO₄ (1,5 M) e neutralizada posteriormente, com NaOH (10%). Em seguida, ocorreu a filtração e completou-se o volume para 10 ou 15 mL. Coletou-se, então, 0,25 mL junto a 0,50 mL de água e 0,25 mL do reagente de DNS e se aqueceu em banho fervente por 5 min, resfriando-se em banho de gelo para bloquear a reação e completando-se o volume com 4 mL de água destilada. Em sequência, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm e, através de uma curva padrão, obteve-se a concentração de ART em glicose, em g/L. O cálculo do %ART sacarificado da biomassa na hidrólise enzimática ou restante na fração líquida após fermentação foi obtido pela Equação 5.

$$\%ART = 100 \cdot \frac{C\left(\frac{g}{L}\right) \cdot V(L)}{Biomassa (g)} \quad (5)$$

4.2.2. Hidrólise enzimática

Foi utilizada a rota enzimática na hidrólise da biomassa pré-tratada fazendo-se uso da enzima Celulase SIGMA-ALDRICH®, na proporção de 1:2 (g:mL). Para este procedimento foram adicionados a 0,5 g de resíduo, 30 mL da solução tampão de citrato 50 mM e pH 4,8 e 1 mL enzima Celulase de *Aspergillus spp.* SIGMA-ALDRICH®. O frasco com essa suspensão foi levado à reação em banho Dubnoff, a temperatura de 48 °C e rotação de 100 rpm durante 96 horas.

A cada 48 h foram feitas coletas das amostras submetidas a esse processo, com exceção do pré-tratamento ácido do resíduo de graviola, ao qual se fez coleta a cada 24 horas para verificar a influência do tempo de hidrólise na concentração de açúcares presente. A eficiência da hidrólise enzimática foi determinada, em termos de % ART desassimilado e sua eficiência calculada pela Equação 6.

$$\varepsilon = \%ART = 100 \frac{C_{ART} \left(\frac{g}{L}\right)}{C_{biomassa} \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (6)$$

Foi, também, caracterizado o complexo enzimático, pois o conhecimento de sua atividade é importante para verificar a quantidade de complexo inserido nas hidrólises e se ter idéia do custo associado a essa operação. Para isto, foram realizadas determinações da atividade de celulasas totais e endoglucanases, conforme as metodologias propostas por Ghose (1987).

Para as celulasas, foram preparados tubos ensaios, controles, brancos e padrões de glicose. Os tubos de ensaios continham 50 mg do substrato (papel de filtro Watman), 1 mL do tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e 0,5 mL da enzima diluída. Os tubos controles da enzima não continham o substrato e o tubo controle do substrato não continha a enzima. Os tubos padrões da glicose continham 0,5 mL da diluição da glicose e 1 mL do tampão. Foram feitas quatro diluições, em tampão de citrato de sódio, da solução estoque de glicose (3,35 mg/0,5 mL; 2,5 mg/0,5 mL; 1,65 mg/0,5 mL e 1,0 mg/0,5 mL). Os tubos foram incubados em banho termostático a 50°C por 60 min. Após o período de incubação, foram adicionados 3 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) para interromper a reação enzimática. Para dosar os açúcares redutores totais, os tubos foram colocados exatamente por 5 min em banho de água fervente. Em seguida, os tubos foram resfriados até atingir a temperatura ambiente. Antes de proceder à leitura da absorbância no espectrofotômetro a 540 nm, foram adicionados 5 mL de água destilada. A curva de calibração de glicose foi obtida através do gráfico com os valores de absorbância e de concentração de glicose.

Usando a curva de calibração da glicose, foi possível determinar a concentração liberada em cada reação enzimática. A concentração da enzima foi estimada para exatamente 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de Filter Paper Unity - FPU), pela equação da reta, entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima. O cálculo para a atividade celulolítica foi obtido a partir da relação.

$$1 IU = 1 \frac{mmol}{min} \text{ substrato convertido} = 0,18 \frac{mg}{min} \text{ quando o produto é glicose}$$

Como a quantidade absoluta de glicose liberada na medida em FPU a uma diluição crítica é 2 mg, tem-se que

$$2 \text{ mg glicose} = \frac{2}{0,18.0,5.60} \frac{\text{mmol}}{\text{min mL}} = 0,37 \frac{\text{mmol}}{\text{min mL}}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima, que libera 2 mg de glicose na reação que contém 0,37 unidades, é definida pela Equação 7.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Diluição da enzima que libera 2 mg de glicose}} \quad (7)$$

Na determinação da atividade de endoglucanases totais, 0,5mL da amostra foi incubada a temperatura de 50°C durante 30 minutos, em 0,5 mL de tampão citrato 50 mM a pH 4,8. À reação foram adicionados 0,5 mL do substrato carboximetilcelulose 2% (CMC), solubilizada no mesmo tampão do ensaio. As amostras foram incubadas a temperatura de 50°C, durante 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados 3 mL do reagente DNS, levadas a banho fervente durante 5 minutos e, então, adicionados 20 mL de água destilada, sendo em seguida homogeneizados. A absorbância da reação foi medida em espectrofotômetro Shimadzu no comprimento de onda de 540 nm. Como branco, foi utilizado o tampão do ensaio no lugar da amostra. O valor da absorbância obtido do branco da amostra foi descontado dos valores obtidos das leituras das amostras ensaiadas. Este valor foi comparado a uma curva padrão de glicose, com a concentração de 0 – 5 mg/mL. Cada amostra foi ensaiada em triplicada. Uma unidade enzimática foi determinada a liberação de 1 micromol de glicose liberado no período do ensaio por minuto.

4.2.3. Fermentação etanólica

A fermentação ocorreu utilizando 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 resquícios 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.

Inoculou-se um volume da suspensão de células a um caldo suplementado com MgSO_4 (1000 ppm), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1000 ppm) e CaCl_2 (100 ppm), em um volume total de 10% ($V_{\text{suspensão}}/V_{\text{hidrolisado}}$). A fermentação foi encerrada após 48 horas, sendo determinada a concentração de ART e teor alcoólico, pelo método do dicromato (AOAC, 2002), adaptado por Abud (1997). Realizou-se, também, peso seco celular no início e no final do processo, após o processo de centrifugação, ressuspensão das células centrifugadas a 4500rpm por 5 min em água estéril e, após secagem em estufa a 105°C até peso constante, através de gravimetria. As eficiências ou rendimentos teóricos de processo e de fermentação foram calculada pelas Equações 8 e 9, proveniente da equação de Gay-Lussac (0,511 g etanol/g glicose), levando em consideração a quantidade de ART para a hidrólise enzimática.

$$\eta_P(\%) = 100 \cdot \frac{E_{\text{final}} - E_{\text{inicial}}}{0,511 \cdot \text{ART}_{\text{inicial}}} \quad (8)$$

$$\eta_f(\%) = 100 \frac{E_{\text{final}} - E_{\text{inicial}}}{(\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}}) 0,511} \quad (9)$$

4.3. Tratamento dos dados e avaliação das condições ótimas

Os pré-tratamentos e hidrólises foram conduzidos em duplicata, enquanto as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. A partir das medições e análise pelo Software STATISTICA®, determina-se as melhores condições para a produção de etanol 2G. A otimização consiste em ampliar os níveis dos fatores significativos e desconsiderar os não-significativos, devendo-se realizar experimentos para confirmar as respostas obtidas no planejamento fatorial.

4.4. Verificação da viabilidade para a produção de etanol 2G a partir dos resíduos.

As Equações 10 a 14 foram empregadas para se calcular o volume de etanol produzido a partir dos resíduos, permitindo avaliar a potencialidade dos resíduos estudados e, com isto, determinar quantidade de álcool que será gerada.

Para a determinação da produtividade do resíduo (P_R), apresentada na Equação 10, utilizaram-se dados de produtividade (P_F) e rendimento (η_F) da fruta, geralmente considerado 0,60 (para a graviola) e 0,50 (para as demais).

$$P_R = P_F \cdot (1 - \eta_F) \quad (10)$$

A produtividade do resíduo em massa seca (P_{ms}) foi definida pela Equação 11, sendo U a umidade do resíduo de fruta analisado.

$$P_{ms} = P_R \cdot ms = P_R \cdot [1 - U] \quad (11)$$

As determinações de massa de açúcares e de etanol foram obtidas a partir das Equações 12 e 13, respectivamente, sendo X_{ART} a conversão em ART da biomassa pré-tratada e X_{ETANOL} a conversão de ART em etanol do hidrolisado enzimático.

$$m_{ART} = P_{ms} \cdot X_{ART} \quad (12)$$

$$m_{ETANOL} = m_{ART} \cdot X_{ETANOL} \quad (13)$$

O volume de etanol (V_{ETANOL}) foi calculado pela Equação 14, considerando-se a densidade do álcool etílico hidratado combustível 96°GL a 25°C como sendo 0,789 (NOVACANA, 2014).

$$V_{ETANOL} = \frac{m_{ETANOL}}{\text{densidade do etanol}} \quad (14)$$

Nesse modelo de cálculo, algumas considerações foram feitas:

- a matéria-prima é a quantidade de ART, embora nos ensaios de fermentação tenha se utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que apenas fermenta hexose, existindo muitas pentoses e outros açúcares após a hidrólise enzimática e principalmente no licor do pré-tratamento;
- no ART global, considerou-se a fermentação de todo o sacarificado, tanto na hidrólise enzimática como no licor do pré-tratamento;
- o consórcio com outras leveduras fermentadoras de pentoses e de açúcares do sacarificado pode apresentar valores bastante elevados e próximos dos teóricos (0,511 segundo a equação de Gay-Lussac, onde uma molécula de glicose é convertida a duas de etanol);

- para uma condição real, deve-se levar em consideração o licor do pré-tratamento e ensaios de fermentescibilidade, pois nessa etapa há a formação de muitos inibidores da fermentação alcoólica (MOSIER et al., 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos resíduos para o presente trabalho, laranja, maracujá e graviola, foi baseada a partir da caracterização físico-química de vários resíduos de frutas (FARIAS et al., 2013), realizada anteriormente, na qual, através do teste de Tukey, foi observado que a composição, frente a outros resíduos de frutas como acerola, abacaxi e banana, em quase todos os parâmetros, não variava significativamente ao nível de 5%. Outro fator levado em consideração foram seus volumes de produção no Brasil, sendo o país o maior produtor mundial das três culturas, tendo o Estado de Alagoas destaque como maior produtor de laranja lima do Nordeste e as polpas de maracujá e graviola entre as mais comercializadas na região.

As etapas subsequentes serviram como ponto inicial para delimitação de condições ótimas de trabalho, visando contribuir para a obtenção de uma tecnologia adequada para etanol de segunda geração a partir de resíduos de frutas.

5.1. Preparação do resíduo e caracterização bromatológica

A secagem dos resíduos durou em torno de 18 horas, com uma perda de umidade média em torno 80%. A caracterização físico-química, apresentada na Tabela 10, indicou um elevado teor de carboidratos totais, levando-se a supor uma significativa conversão a etanol.

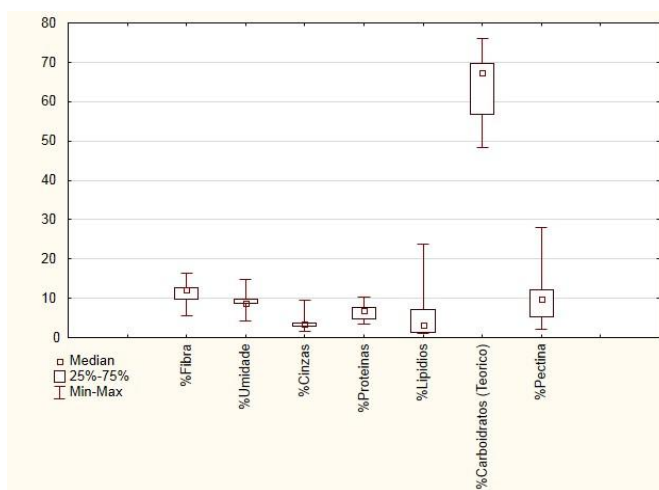
Tabela 10: Caracterização físico-química do bagaço de laranja, do resíduo de graviola e da casca de maracujá desidratados e moídos.

Resíduo	Fibra bruta (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidrato total (%)	Pectina (%)	Referência
Laranja	12,23±2,95	10,05±0,10	3,46±0,07	3,38±0,69	1,74±0,28	69,14	12,03±0,55	Este Trabalho
	11,04	12,16	4,92	4,85	2,16	70,08	-	Ruviaro et al, 2008
	7,17	0,96	-	11,08	6,00	-	-	Clemente et al, 2012
	-	13,36	8,57	7,93	3,44	68,85	-	Retore et al, 2010
Graviola	9,78 ± 3,87	9,69 ± 0,38	3,50±0,40	7,37±0,02	3,20±0,07	66,46	9,75±1,25	Este Trabalho
	-	12,2	5,7	10,7	1,6	-	-	Pereira et al, 2008
	-	11,74	-	9,85	7,97	72,03	-	Rogério et al, 2011
	-	8,25	-	13,75	4,46	-	-	Cysne, 2004
Maracujá	13,79±0,63	8,82± 0,74	2,02±0,41	4,68±0,29	0,99±0,06	69,70	27,88±1,02	Este Trabalho
	-	-	8,66	12,52	1,75	77,05	-	Souza et al, 2008
	-	-	4,61	5,42	0,08	56,85	-	Gondim et al, 2005

Fonte: Autor (2014).

O teor de carboidratos, aliado ao percentual de fibra bruta, reflete um pedaço da fração lignocelulósica dessa biomassa. Em uma análise pelo gráfico de Box, ilustrada na Figura 15, percebe-se que o teor médio de carboidratos se encontra em torno de 70%, com os componentes adicionais inferiores a 10%. Entre os carboidratos, um componente que merece destaque é a pectina, em especial ao resíduo de maracujá, com cerca de 28%.

Figura 15: Gráfico de Box para as variáveis estudadas.



Fonte: Autor (2014).

5.2. Pré-tratamento

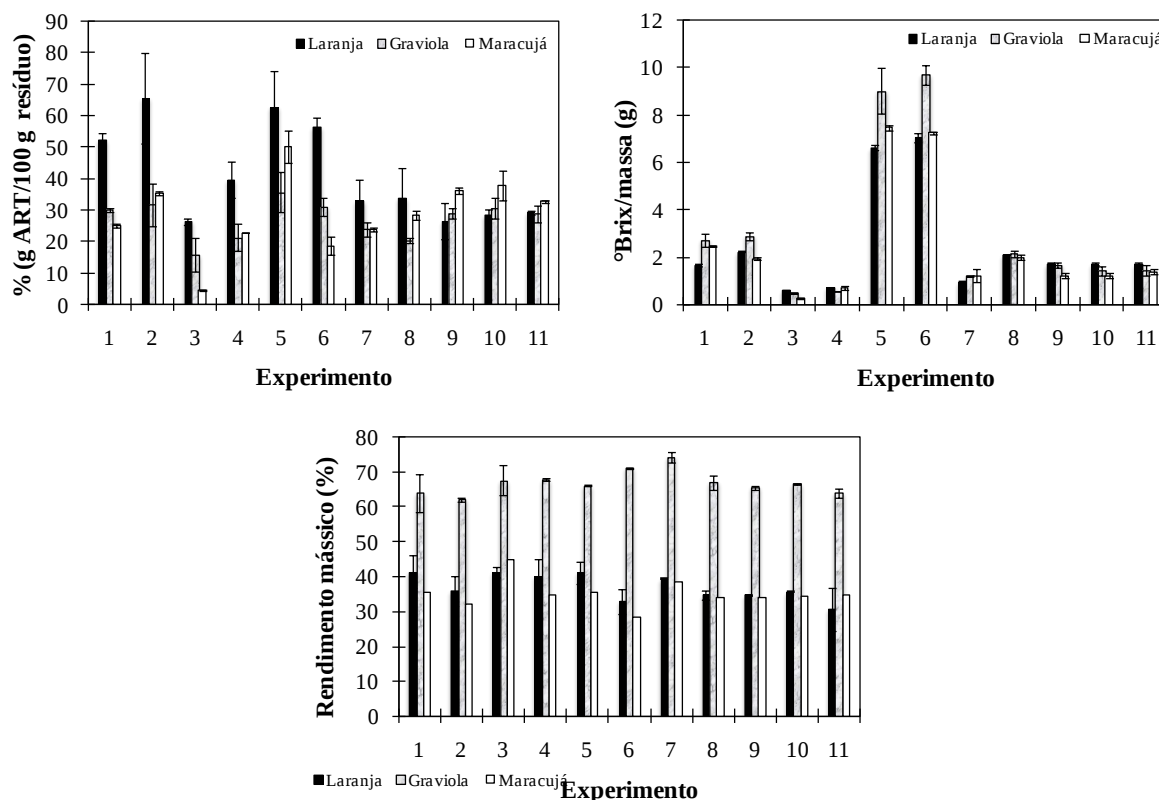
Na determinação do grau de severidade (Equação 1) para cada condição dos experimentos realizados no pré-tratamento ácido, obteve-se que o menor tempo de tratamento (15 min) ocorre de forma branda ($R_0 = 1,04$). A agressão do tratamento com ácido sulfúrico ocorreu com o tempo intermediário (60 min), considerada severa ($R_0 = 4,15$). Nos ensaios conduzidos com o maior tempo de aquecimento (120 min) obteve-se um grau de severidade elevado ($R_0 = 8,30$), indicando condições extremamente agressivas à biomassa.

Após o pré-tratamento foram gerados dois produtos: o hidrolisado (fração líquida), que contém os materiais dissolvidos da biomassa, e o resíduo sólido, que é a parte não reativa da biomassa nas condições aplicadas durante o pré-tratamento. Os açúcares solúveis liberados no pré-tratamento ácido em autoclave variaram de 25 a 65% para o bagaço de laranja, de 15 a 35% para o resíduo de graviola e de 5 a 50% para o resíduo de maracujá.

Os maiores valores de solubilização de açúcares foram obtidos utilizando-se maior tempo de pré-tratamento, apesar de não muito distantes dos encontrados para menor tempo. Na quantidade de sólidos totais solúveis incorporados da fração sólida para a líquida, os

resultados diferiram bastante entre o menor e maior tempo de pré-tratamento, sendo o maior com elevadíssima solubilização. A quantidade de biomassa influenciou negativamente (Figura 16).

Figura 16: Resultados obtidos no pré-tratamento ácido dos resíduos.



Fonte: Autor (2014).

Macedo et al. (2011), utilizando torta de pequi como biomassa no pré-tratamento com ácido sulfúrico, em concentrações de 2 a 5% e temperatura de 123°C, obtiveram uma sacarificação entre 7 e 17% em termos de ART. Provavelmente, o fator responsável pela baixa quantidade de açúcares liberados foi a grande quantidade de biomassa utilizada (20 g), tendo em vista que se verificou maior sacarificação nos ensaios com menor quantidade de resíduo.

No pré-tratamento com ácido sulfúrico a 1%, casca da banana como fonte de biomassa, tempo de aquecimento de 15 minutos e temperatura de 120°C, Souza et al. (2012) alcançaram um rendimento médio de 9,5% de açúcares liberados em termos de ART, valores abaixo do encontrado para a sacarificação neste estudo, que utilizou concentrações mais elevadas do ácido sulfúrico (1 a 5%).

Segundo Vaccarino et al. (1989), que avaliaram o processo de pré-tratamento com

casca de laranja em ácido sulfúrico diluído (0,2, 0,4 e 0,6%), C_{biomassa} (7,4 a 18,5%) e aquecimento a 100°C por 1,5 h, houve um aumento do rendimento mássico com o aumento da C_{biomassa} , situando-se entre 39 e 62%. Verificaram, ainda, que os açúcares redutores totais liberados no licor variaram entre 21,3 a 45,8%, sendo os maiores valores obtidos em maior concentração de ácido e menor quantidade de resíduo.

Grohmann et al. (1995), estudando o pré-tratamento com ácido sulfúrico de bagaço de laranja (0,06 e 0,5%), em temperaturas de 100, 120 e 140°C e tempo de aquecimento de 40 min, obtiveram rendimento mássico entre 18 e 30%. Em 120°C e entre 10 e 40 min, temperatura e faixa de tempo aproximada empregadas nos experimentos realizados neste trabalho, houve uma desassimilação de ART de 11 a 37%, para concentrações de ácido de 0,5 e 0,06%, respectivamente. Filho (2011) promoveu a hidrólise ácida do pseudocaule da bananeira com ácido sulfúrico 1%, a 120°C por 15 minutos, e conseguiu 13,3% de rendimento em termos de sacarificação.

O rendimento mássico foi maior para o resíduo de graviola, situando-se em um valor médio de 60%, sem muitas variações, enquanto que para os bagaço de laranja e casca de maracujá, o valor médio foi de 40%. Essa diferença está associada à solubilização de açúcares, já citada anteriormente e visualizada na Figura 16. A degradação dos açúcares pode ser influenciada pela presença do ácido, altas temperaturas e tempo de exposição prolongado, gerando, também, compostos inibidores do posterior processo de fermentação, dentre os quais o hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (MOSIER et al., 2005).

No pré-tratamento alcalino, perceberam-se menores rendimentos mássicos, cerca de 30 a 50%, com exceção para os ensaios 3 e 4, provavelmente por possuírem muita biomassa para o tempo de pré-tratamento e não conseguirem ter um efetivo tratamento, formando, visualmente, uma goma, mais expressiva no bagaço de laranja e casca de maracujá (Figura 17).

Figura 17: Aspecto visual do hidrolisado e resíduo após tratamento alcalino.

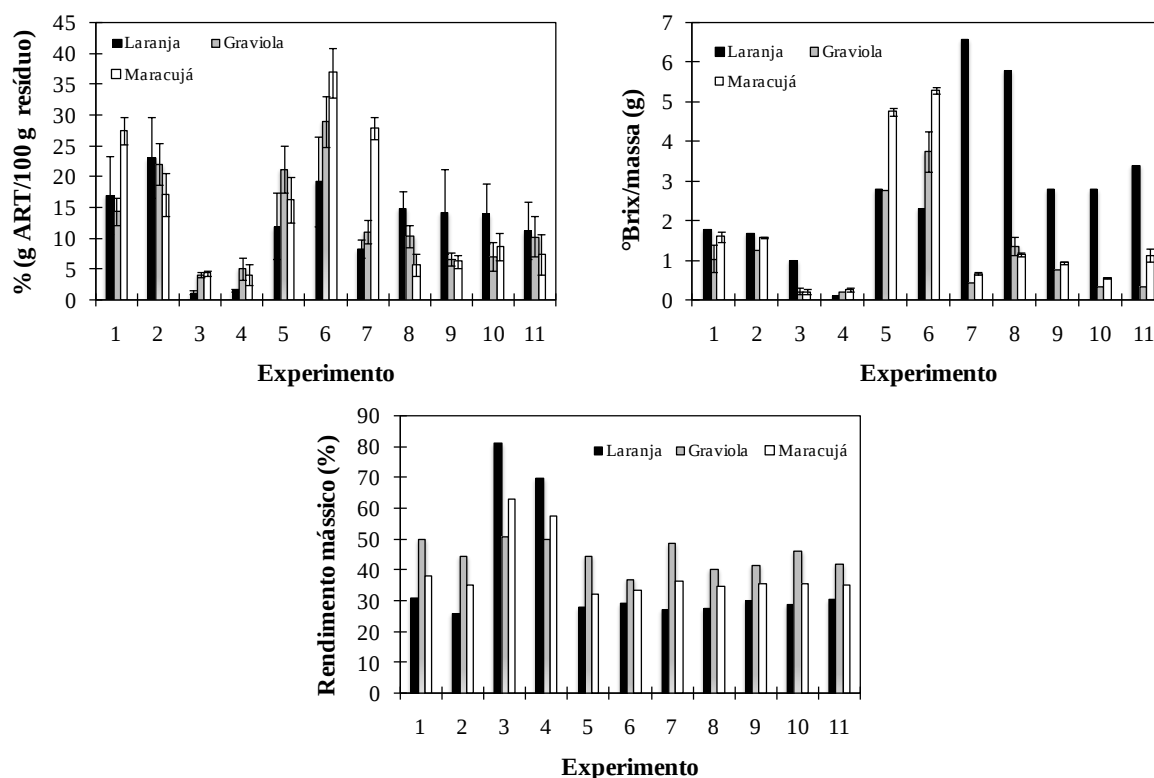


Fonte: Autor (2014).

É característica do tratamento alcalino a remoção da fração de lignina e da hemicelulose (MOSIER et al., 2005; SOUSA et al., 2012), tendo como fração residual apenas uma pequena porcentagem de lignina e de hemicelulose, além da fração celulósica (Figura 18). Isto também gera maiores valores de $^{\circ}\text{Brix}/\text{g}_{\text{biomassa}}$, ou seja, uma maior solubilização de frações e um menor teor de sacarificação. No entanto, os compostos também podem ser degradados, fato que explica diminuição com o aumento do tempo de %ART e também de $^{\circ}\text{Brix}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ (principalmente do casca de maracujá e residuo de graviola).

Todavia, cabe ressaltar que apenas a desassimilação de açúcares no licor do pré-tratamento não avalia a eficiência do processo, pois se deve pensar na sacarificação das hexoses, presentes principalmente na fração celulósica, o que implica na necessidade de uma etapa posterior de hidrólise enzimática ou caracterização da fração sólida restante para ser avaliada.

Figura 18: Resultados do pré-tratamento alcalino dos resíduos.



Fonte: Autor (2014).

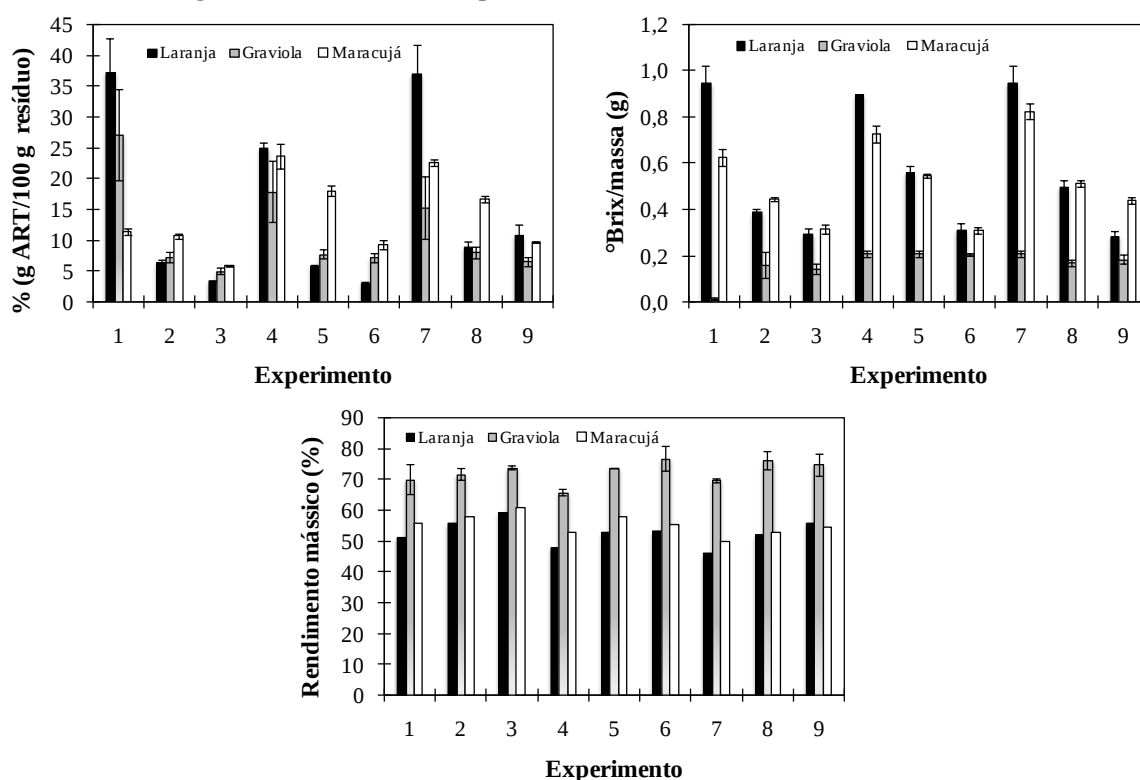
Os resultados mostram que o tempo influenciou positivamente, indicando que se consegue extrair mais compostos da estrutura dos resíduos com o aumento do tempo. Efeito similar foi encontrado por Sousa et al. (2012) em capim *Panicum maximum* pré-tratado em tempos de 30 a 60 min e C_{base} de 0,5 a 5%. Para o rendimento mássico, percebeu-se que a

C_{base} e o tempo atuaram negativamente, apontando que seu aumento favorece a solubilização da fração lignocelulósica.

Sousa et al. (2012) verificaram que o aumento da C_{base} e o tempo solubilizam mais eficientemente a hemicelulose e a lignina, embora também aumente a extração de celulose, porém de forma menos significativa quando comparada as duas primeiras solubilizações. Oliveira (2012), estudando a deslignificação da palha de cana, percebeu que, usando NaOH 1% por 1 h a 100°C, removeu-se cerca de 80% da lignina com a palha previamente explodida a vapor.

No pré-tratamento hidrotérmico, cujos dados são apresentados na Figura 19, conseguiu-se elevados teores de sacarificação para as menores quantidades de biomassa, decaindo de 35 para 5%, em 1h. Não foram significativas as diferenças do tempo de permanência no reator, entre 1 e 2 horas.

Figura 19: Resultados do pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos.



Fonte: Autor (2014).

Provavelmente pelo aumento de biomassa na solução, houve uma menor ação autocatalítica com a diminuição da relação água/superfície da biomassa. Esta afirmação pode ser confrontada com o rendimento mássico, que se situou, sem muitas flutuações, em 50% para o bagaço de laranja e resíduo de maracujá e 70% para o resíduo de graviola. A mesma tendência

apresentada pela sacarificação em termos de ART foi encontrada na quantidade de sólidos totais solúveis (Figura 19).

Pitarelo (2007), avaliando o processo hidrotérmico em tempos de 4, 6 e 8 min, temperaturas de 195, 202,5 e 210°C e umidades de 8, 33 e 50%, percebeu que, com o aumento do tempo de residência no reator, ocorreram maiores perdas no processo de pré-tratamento, sendo essa perda atribuída à prolongada exposição do material a altas temperaturas e ao subsequente aumento dos índices de desidratação dos carboidratos presentes no bagaço (decomposição).

5.3. Hidrólise enzimática

Na caracterização do complexo enzimático utilizado, obteve-se uma atividade de 5,91 FPU/mL para endocelulases ou endoglucanases e de 3,74 FPU/mL para celulases totais. Esses valores são baixos, porém característico do coquetel de enzima empregado no estudo. Castro e Pereira Jr (2010), avaliando vários coquetéis de enzima na hidrólise de materiais lignocelulósicos, mostram que, geralmente, a faixa utilizada é entre 15 a 25 FPU/mL para celulases totais, muito embora coquetéis de 80 e 5 FPU/mL tenham sido estudados.

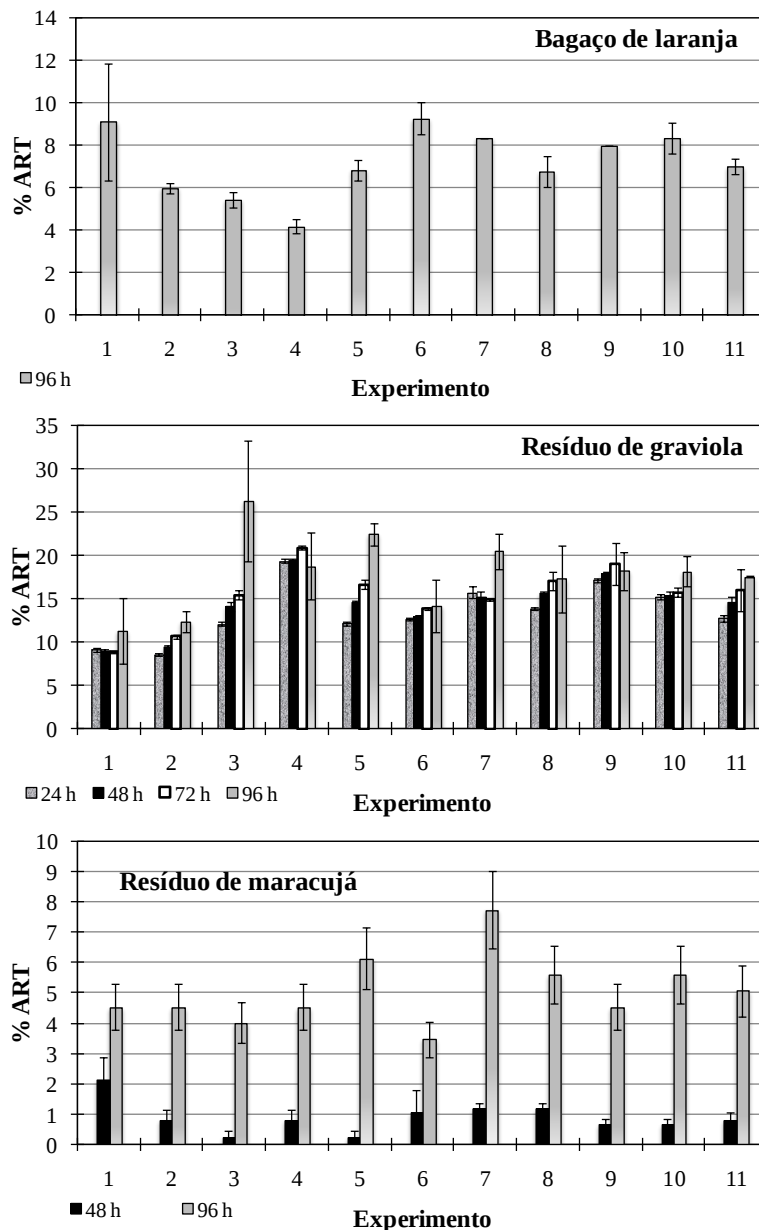
A hidrólise enzimática foi realizada na biomassa pré-tratada, neutralizada e seca a 37°C até peso constante. Pelos resultados expressos na Figura 20, pode-se verificar que o pré-tratamento ácido do bagaço de laranja e do resíduo de maracujá promoveram a sacarificação da maior parte de açúcares, restando à etapa de hidrólise menos de 10%, ou seja, grande parte da celulose presente, provavelmente, foi solubilizada com as outras frações de polímeros fibrosos, mostrando que mesmo os pré-tratamentos com menor concentração de biomassa e tempo foram severos a esse tipo de biomassa, fato alertado por Sun e Cheng (2002), e/ou a enzima não conseguiu ser eficiente devido à baixa atividade mencionada acima.

Os resíduos de graviola se comportaram de modo diferente, obtendo rendimentos entre 10 e 25%. Isso se deve à composição da biomassa, sendo os melhores resultados obtidos com a maior concentração de resíduo, menor tempo e menor concentração de ácido. Também no resíduo de graviola, de forma a comparar a importância do tempo de hidrólise enzimática, foram realizadas coletas de amostra a cada 24 h onde se observa que o tempo de 96 h é considerado o ideal para uma sacarificação eficiente da biomassa; para os outros resíduos e pré-tratamentos foi realizado apenas coletas em 48 e 96 horas.

Choi et al. (2012) promoveram a hidrólise enzimática de cascas de tangerina utilizando uma mistura de enzimas envolvendo celulase, pectinase, xilanase e β -glicosidade, a

45°C durante 24 horas e obtiveram 43,6% de sacarificação. Esse valor, superior ao encontrado no presente trabalho, é função, provavelmente, do coquetel de enzimas empregado.

Figura 20: Hidrólise enzimática da biomassa oriunda do pré-tratamento ácido.



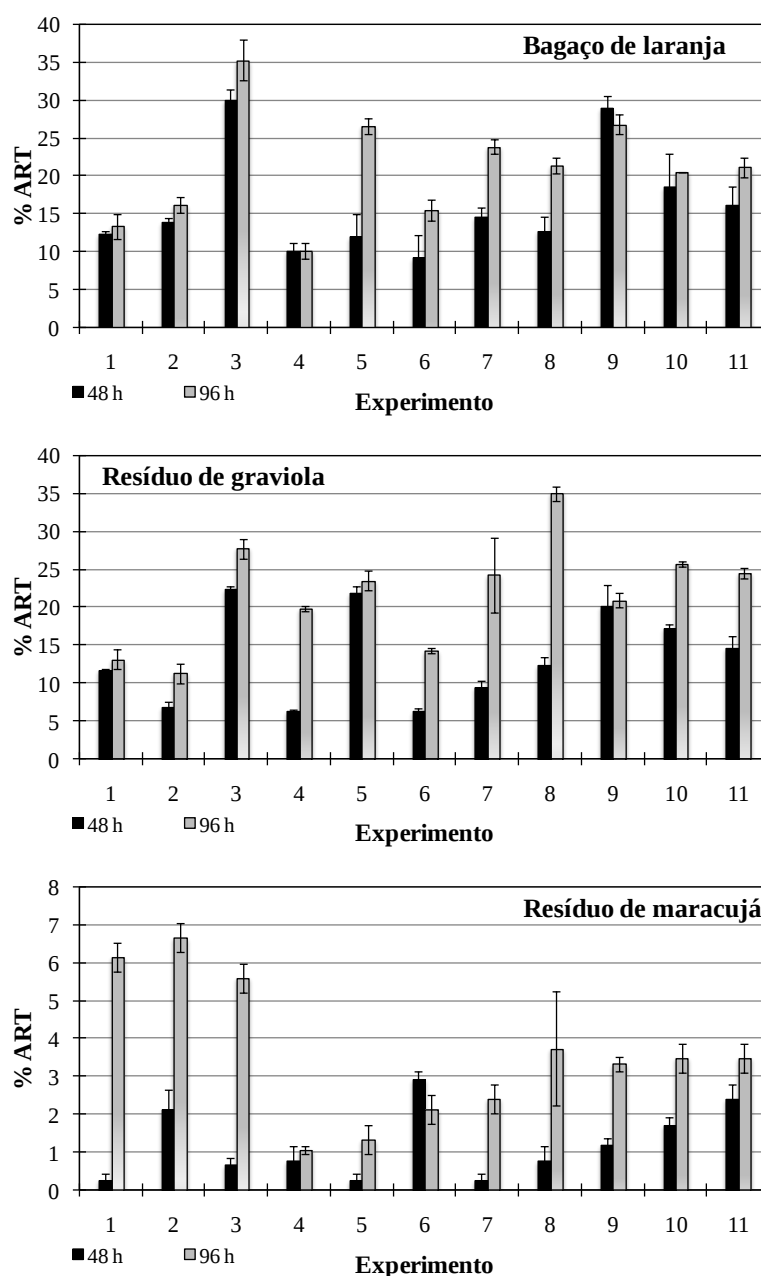
Fonte: Autor (2014).

Segundo Hendriks et al. (2009), a redução no tamanho de partícula provoca um aumento na superfície disponível, favorecendo a hidrólise enzimática, razão pela qual neste trabalho utilizou-se uma redução das partículas a 30 mesh. De acordo com Sun e Cheng (2002), o pré-tratamento dos materiais para remoção tanto da hemicelulose quanto da lignina tem o propósito de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material, proporcionando, assim, maior eficiência da hidrólise enzimática de substratos

lignocelulósicos. No entanto, não se pode remover tanto a ponto de se extrair parte da celulose.

A etapa de hidrólise do pré-tratado alcalino, em ambos os casos, bagaço de laranja e resíduo de graviola, resultaram em rendimentos máximos de até 35%, como mostra a Figura 21. Para a casca de maracujá, obteve-se menos de 10%. O menor rendimento mássico pode ter sido influenciado pela remoção de grande parte da lignina no tratamento alcalino. Todavia, sabe-se que nem tudo pode ser proveniente da celulose, devendo-se avaliar na etapa de fermentação a conversão desses açúcares em etanol.

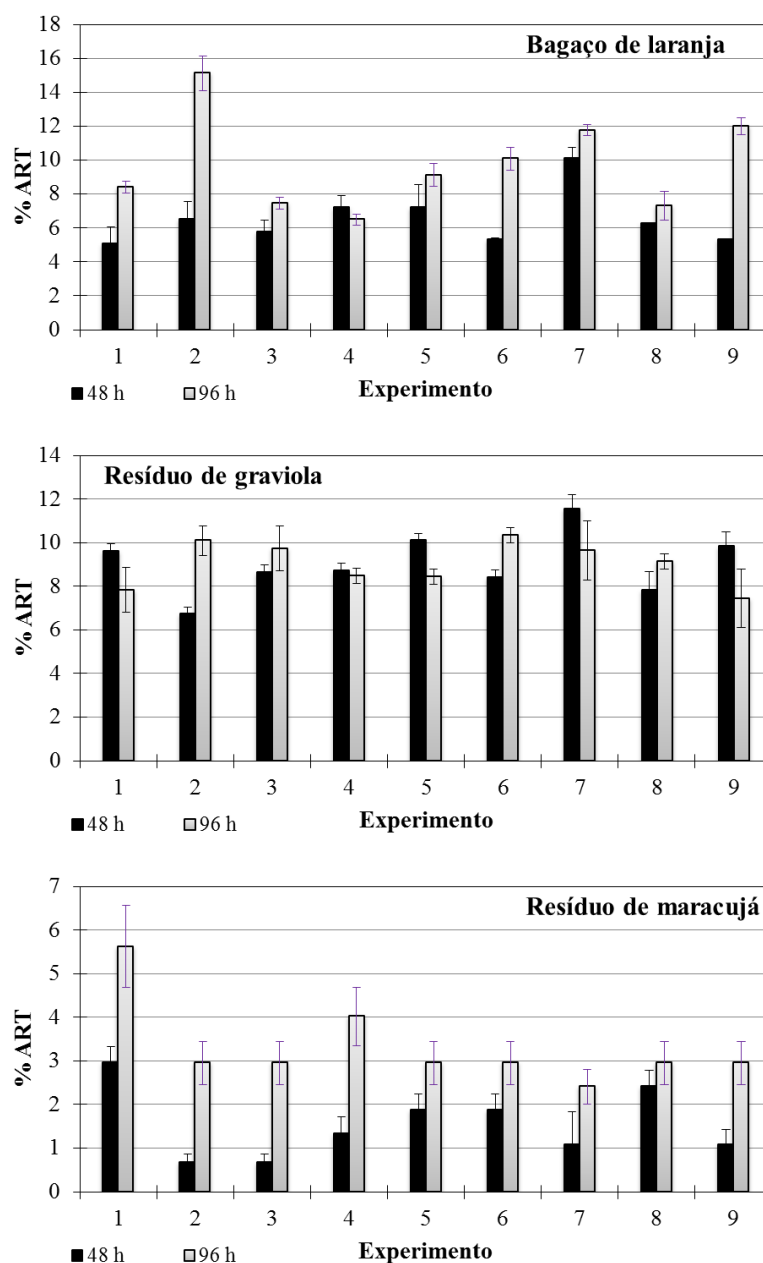
Figura 21: Hidrólise enzimática da biomassa oriunda de pré-tratamento alcalino.



Fonte: Autor (2014).

A hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada hidrotêrmicamente, apresentada na Figura 22, gerou menor sacarificação, sugerindo que as condições utilizadas não foram suficientes para quebrar a estrutura, proporcionando uma ação auto-catalítica muito baixa.

Figura 22: Hidrólise enzimática da biomassa oriunda do pré-tratamento hidrotêrmico.



Fonte: Autor (2014).

5.4. Fermentação etanólica

As fermentações ocorreram nos caldos oriundos da hidrólise enzimática. Seus dados são apresentados na Tabela 11. Percebe-se que os rendimentos de fermentação no resíduo de

graviola pré-tratado em ácido variaram entre 9 e 50%, sendo os menores gerados a partir de um menor tempo de tratamento ácido (15 min), independentemente da concentração de biomassa utilizada.

Tabela 11: Dados da fermentação etanólica dos resíduos pré-tratados e hidrolisados enzimaticamente.

		Experimento											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Bagaço de laranja	Ácido	Y _{X/S}	0,06	0,10	0,16	0,17	0,06	0,06	0,13	0,09	0,06	0,06	0,04
		Y _{X/E}	1,40	1,79	0,52	0,83	0,71	0,67	1,41	0,87	0,87	0,91	0,36
		Y _{E/S}	0,04	0,06	0,32	0,20	0,08	0,10	0,09	0,10	0,07	0,06	0,12
		η _P (%)	7,21	9,49	31,28	30,24	12,82	16,97	16,30	15,55	11,50	11,04	19,34
		η _f (%)	7,83	11,12	62,20	39,50	15,12	18,69	18,22	19,55	12,87	12,66	23,76
	Alcalino	Y _{X/S}	0,32	0,19	0,40	2,52	0,24	0,59	0,35	0,53	0,14	0,18	0,16
		Y _{X/E}	1,89	1,79	9,44	11,30	1,15	1,12	1,19	1,88	1,58	1,13	0,82
		Y _{E/S}	0,17	0,10	0,04	0,22	0,21	0,52	0,29	0,28	0,09	0,16	0,19
		η _P (%)	18,95	14,97	6,99	25,76	26,28	33,91	27,04	30,99	13,60	18,37	29,09
		η _f (%)	35,54	20,28	8,22	43,44	40,18	100	56,98	55,26	16,85	31,70	37,11
	Hidrotérmico	Y _{X/S}	1,29	0,42	0,69	1,92	1,29	1,12	0,49	1,29	0,50		
		Y _{X/E}	4,29	7,05	6,05	4,89	9,29	7,32	6,37	7,68	3,68		
		Y _{E/S}	0,30	0,06	0,11	0,39	0,14	0,15	0,08	0,17	0,14		
		η _P (%)	20,10	19,14	14,44	28,43	11,78	10,66	11,75	18,88	10,97		
		η _f (%)	58,72	11,52	22,40	76,86	27,14	28,89	15,15	32,92	26,81		
Resíduo de graviola	Ácido	Y _{X/S}	0,78	0,43	0,11	0,40	0,14	0,45	0,22	0,25	0,20	0,10	0,20
		Y _{X/E}	3,13	1,65	2,10	1,91	2,74	1,96	1,56	1,26	1,15	1,31	1,34
		Y _{E/S}	0,25	0,26	0,05	0,21	0,05	0,23	0,14	0,20	0,17	0,15	0,15
		η _P (%)	16,92	21,20	7,81	23,37	7,66	25,50	16,24	24,62	18,60	19,18	19,45
		η _f (%)	48,35	50,37	10,11	40,80	9,67	44,66	28,13	38,66	33,71	28,49	28,82
	Alcalino	Y _{X/S}	0,39	0,30	0,14	0,53	0,14	0,29	0,12	0,08	0,11	0,10	0,12
		Y _{X/E}	1,59	1,29	0,44	1,71	0,54	1,93	3,68	2,15	1,13	0,58	1,03
		Y _{E/S}	0,25	0,24	0,32	0,31	0,36	0,15	0,03	0,04	0,10	0,18	0,12
		η _P (%)	21,90	27,87	42,53	18,63	39,01	21,90	5,41	5,55	15,02	34,70	22,61
		η _f (%)	48,04	46,06	61,66	60,73	50,23	29,84	6,57	6,97	19,08	28,65	18,20
	Hidrotérmico	Y _{X/S}	1,18	0,67	0,78	0,48	0,59	1,37	1,04	0,79	1,71		
		Y _{X/E}	4,82	3,48	4,79	1,98	3,20	9,35	9,01	4,73	6,54		
		Y _{E/S}	0,24	0,19	0,16	0,24	0,18	0,15	0,12	0,17	0,26		
		η _P (%)	21,31	16,74	14,75	21,31	16,44	13,38	10,65	15,14	22,68		
		η _f (%)	47,82	37,77	31,91	47,82	35,89	28,72	22,53	32,82	51,31		
Resíduo de maracujá	Ácido	Y _{X/S}	0,72	0,80	0,51	0,40	0,18	0,43	0,20	0,32	0,46	0,34	0,29
		Y _{X/E}	2,46	1,84	1,36	1,02	1,02	0,86	0,98	1,00	1,02	1,39	0,75
		Y _{E/S}	0,29	0,44	0,38	0,39	0,17	0,50	0,21	0,32	0,45	0,25	0,38
		η _P (%)	30,31	30,31	34,39	40,42	22,37	61,79	27,78	35,40	47,16	29,96	51,20
		η _f (%)	57,08	85,33	73,46	76,10	34,20	98,80	40,31	61,73	88,79	48,25	74,68
	Alcalino	Y _{X/S}	0,26	0,32	0,44	1,77	0,73	0,81	0,81	1,14	0,59	0,60	0,52
		Y _{X/E}	0,91	1,95	5,10	4,43	2,04	3,21	1,65	2,73	1,22	1,19	1,29
		Y _{E/S}	0,28	0,16	0,09	0,40	0,36	0,25	0,49	0,42	0,48	0,50	0,40
		η _P (%)	39,76	20,57	8,17	45,71	54,85	35,55	66,55	28,90	68,57	79,44	57,37
		η _f (%)	55,35	32,04	17,07	78,22	69,81	49,40	96,84	81,79	93,86	98,42	78,
	Hidrotérmico	Y _{X/S}	0,28	0,46	0,64	0,56	0,87	0,35	0,73	0,50	0,74		
		Y _{X/E}	0,96	1,13	2,40	1,94	1,78	0,81	1,58	1,21	1,50		
		Y _{E/S}	0,29	0,41	0,27	0,29	0,49	0,43	0,46	0,42	0,49		
		η _P (%)	24,50	47,00	26,11	19,09	36,55	57,44	46,91	57,44	47,00		
		η _f (%)	56,80	79,66	52,32	56,98	95,18	84,36	90,76	81,69	95,95		

Fonte: Autor (2014).

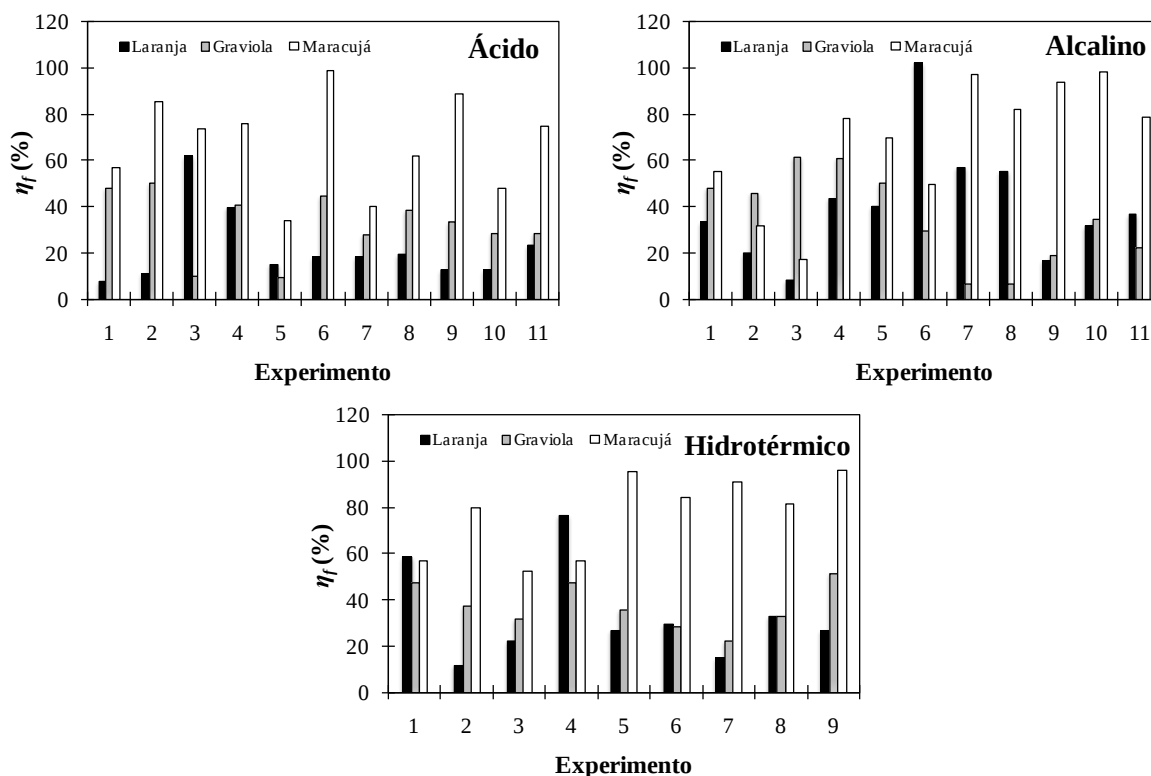
Uma hipótese pelo baixo rendimento de alguns experimentos seria a hidrólise de açúcares não metabolizados, bem como tempo de fermentação escolhido. Os experimentos com rendimentos razoáveis ocorreram, provavelmente, em função da baixa presença de inibidores, além do enriquecimento do mosto com nutrientes adicionados ao meio de cultura.

Nos pré-tratamentos alcalinos obtiveram-se maiores rendimentos de fermentação, fato que pode estar associado à maior presença de açúcares alcançados na hidrólise enzimática, bem como à remoção de lignina, uma das características principais do pré-tratamento com hidróxido de sódio (MOISER et al., 2005).

As maiores taxas de hidrólise e fermentação ocorreram nos ensaios 3 e 4 para os pré-tratamentos alcalinos e ácidos, que possuem a maior quantidade de biomassa e menor tempo de tratamento, sugerindo esse ser um ponto de partida para otimizações desse processo. Com relação à concentração celular, os valores se situaram entre 0,2 e 1,0 g/ L, com exceção do ensaio 3 e 4 para o pré-tratamento alcalino, que pode ter gerado menor crescimento devido aos restos de pectina precipitada, fato já verificado por Grohmann et al. (1995).

A Figura 22 apresenta as eficiências de fermentação para os hidrolisados ácido, alcalino e hidrotérmico.

Figura 22: Perfis de rendimento de fermentação dos hidrolisados.



Fonte: Autor (2014).

Para etanol, os valores variaram entre 0,2 a 1,0 g/L. Como a fermentação envolve muitos aspectos bioquímicos e dependentes das condições do processo, ficou difícil explicar de forma detalhada a influência das variáveis nesse processo. Percebeu-se que o rendimento de fermentação se comportou de modo diverso entre os ensaios. Para o pré-tratamento ácido, os pré-tratados com menor tempo (15 min) obtiveram maiores taxas de rendimento de fermentação, enquanto que para o alcalino e hidrotérmico se situaram em um maior tempo de pré-tratamento (120 min), talvez por exigência reacional, sendo para o alcalino a retirada de lignina e para o hidrotérmico a quebra da estrutura lignocelulósica.

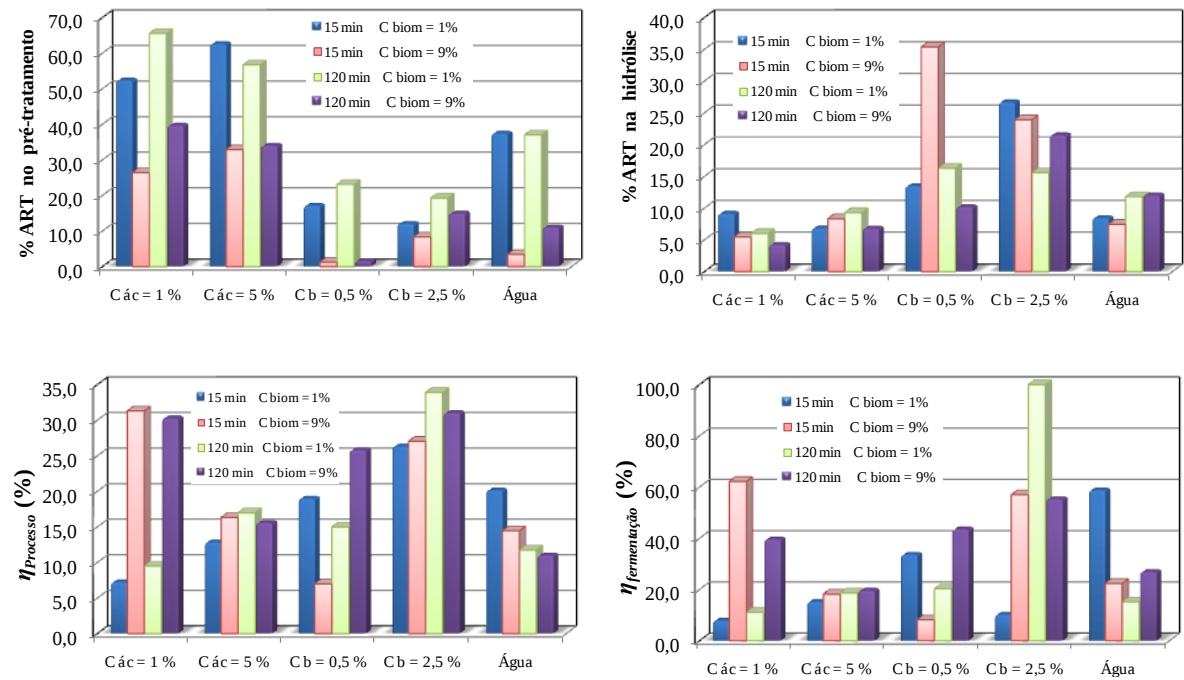
No estudo realizado por Sharma et al. (2007) foram empregadas como fonte de biomassa uma mistura de casca de banana *Musa sp.* e cascas de tangerina, secas e moídas, obtendo um rendimento máximo de etanol 42,6%. Paganini et al. (2005) usaram como substrato o bagaço de maçã, tendo um rendimento de 44%. Schulz (2010), aproveitando cascas de banana como fonte de biomassa, obteve 34% de rendimento teórico de etanol. Estes valores estão próximos aos encontrados em alguns experimentos neste trabalho.

5.5. Tratamento de dados

Os dados foram discutidos por tratamento químico (ácido, alcalino e hidrotérmico), fazendo-se um comparativo entre os resíduos. De forma a avaliar a melhor condição de pré-tratamento por tipo de resíduo, os dados foram agrupados conforme a Tabela 12 e avaliados em seus limites, como mostram as Figuras 23 a 25, com parâmetros do bagaço de laranja, resíduo de graviola e resíduo de maracujá, respectivamente. Avaliando essas figuras, pode-se discutir melhor sobre o teor de açúcares (%ART) liberado no pré-tratamento e na hidrólise e o rendimento de fermentação ao final do processo.

Pelas condições limites do planejamento percebe-se que o pré-tratamento ácido para os três resíduos liberou mais %ART da biomassa que o alcalino e hidrotérmico. É conhecido que os carboidratos se hidrolisam mais facilmente em meio ácido sob aquecimento (Agbor et al., 2011).

Figura 23: Avaliação das condições limites do planejamento com bagaço de laranja.



Fonte: Autor, 2014.

Tabela 12. Agrupamento dos dados experimentais dos resíduos nos diferentes pré-tratamentos.

Laranja	Ácido							Alcalino							Hidrotérmico						
	Condição			% ART		Fermentação		Condição			% ART		Fermentação		Condição		% ART		Fermentação		
	T (min)	C _{ac} (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _b (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	
1	15	1	1	52,29	9,11	7,21	7,83	15	0,5	1	17,07	13,43	18,95	33,54	15	1	37,35	8,41	20,1	58,72	
2	120	1	1	65,52	6	9,49	11,12	120	0,5	1	23,08	16,27	14,98	20,28	15	5	6,41	15,13	9,14	11,52	
3	15	1	9	26,37	5,46	31,29	62,2	15	0,5	9	1,27	35,37	7	8,22	15	9	3,43	7,45	14,44	22,4	
4	120	1	9	39,59	4,2	30,25	39,5	120	0,5	9	1,51	10,14	25,77	43,44	67,5	1	25,05	6,49	28,43	76,86	
5	15	5	1	62,53	6,83	12,82	15,12	15	2,5	1	12	26,65	26,28	40,18	67,5	5	5,75	9,13	11,78	27,14	
6	120	5	1	56,7	9,29	16,98	18,69	120	2,5	1	19,26	15,56	33,91	102,55	67,5	9	3,08	10,09	10,66	29,89	
7	15	5	9	32,89	8,33	16,3	18,22	15	2,5	9	8,36	23,91	27,04	56,98	120	1	37,02	11,77	11,75	15,15	
8	120	5	9	33,95	6,76	15,55	19,55	120	2,5	9	14,88	21,46	30,99	55,26	120	5	8,92	7,33	18,88	32,92	
9	67,5	3	5	26,4	8	11,5	12,87	67,5	1,5	5	14,31	26,88	13,6	16,85	120	9	10,97	12,01	10,97	26,81	
10	67,5	3	5	28,68	8,33	11,04	12,66	67,5	1,5	5	14,07	20,57	18,37	31,7							
11	67,5	3	5	29,3	7,02	19,34	23,76	67,5	1,5	5	11,29	21,22	29,1	37,11							

T = tempo C_{ác} = concentração de ácido C_b = concentração de base C_{bio} = concentração de biomassa PT = pré-tratamento HE = hidrólise enzimática

Graviola	Ácido							Alcalino							Hidrotérmico						
	Condição			% ART		Fermentação		Condição			% ART		Fermentação		Condição		% ART		Fermentação		
	T (min)	C _{ac} (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _b (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	
1	15	1	1	29,99	11,36	16,92	48,35	15	0,5	1	14,43	13,2	21,9	48,04	15	1	27,13	7,83	21,31	47,82	
2	120	1	1	31,7	12,42	21,21	50,37	120	0,5	1	22,14	11,32	27,87	46,06	15	5	7,26	10,09	16,74	37,77	
3	15	1	9	15,96	26,39	7,81	10,11	15	0,5	9	4,08	27,81	42,54	61,66	15	9	5,06	9,73	14,75	31,91	
4	120	1	9	21,21	18,82	23,38	40,8	120	0,5	9	5,12	19,86	18,64	60,73	67,5	1	17,93	8,48	21,31	47,82	
5	15	5	1	35,65	22,51	7,66	9,67	15	2,5	1	21,23	23,58	39,01	50,23	67,5	5	7,76	8,43	16,44	35,89	
6	120	5	1	31,09	14,19	25,7	44,66	120	2,5	1	28,95	14,38	21,9	29,84	67,5	9	7,22	10,33	13,38	28,72	
7	15	5	9	23,88	20,55	16,24	28,13	15	2,5	9	11,1	24,31	5,41	6,57	120	1	15,3	9,65	10,65	22,53	
8	120	5	9	20,29	17,32	24,62	38,66	120	2,5	9	10,4	35,11	5,99	6,97	120	5	8,06	9,13	15,14	32,82	
9	67,5	3	5	28,97	18,24	18,61	33,71	67,5	1,5	5	6,71	21	15,02	19,08	120	9	6,56	7,45	22,68	51,31	
10	67,5	3	5	30,61	18,22	19,19	28,49	67,5	1,5	5	7,03	25,73	28,66	34,7							
11	67,5	3	5	28,81	17,59	19,45	28,82	67,5	1,5	5	10,34	24,55	18,2	22,61							

T = tempo C_{ác} = concentração de ácido C_b = concentração de base C_{bio} = concentração de biomassa PT = pré-tratamento HE = hidrólise enzimática

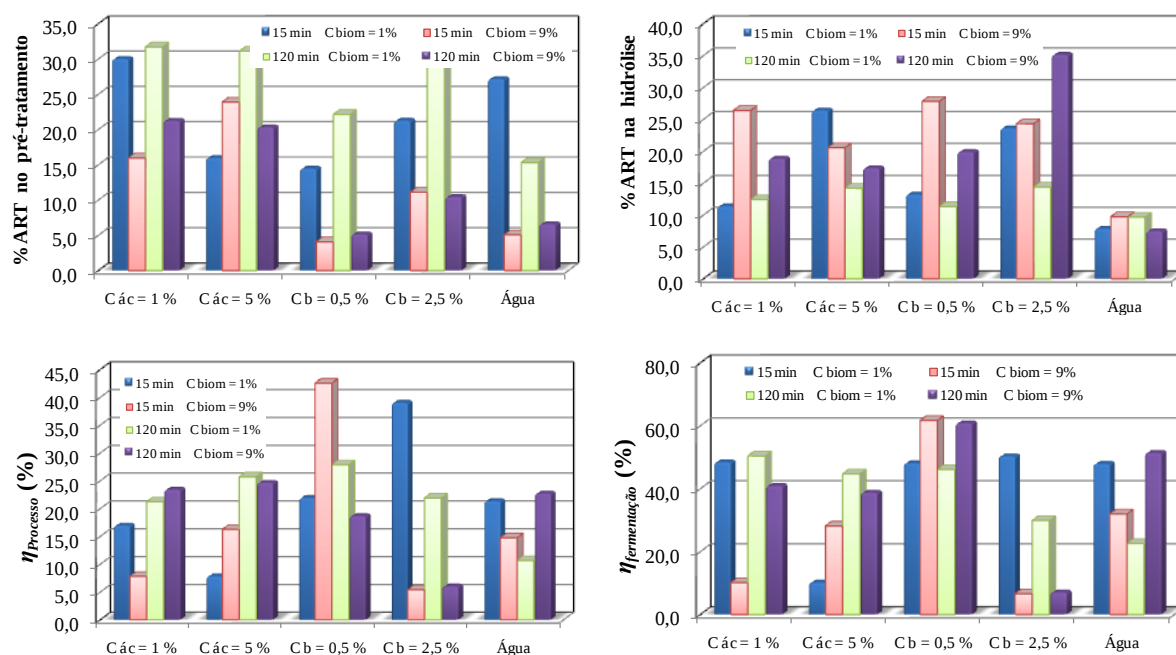
Maracujá	Ácido							Alcalino							Hidrotérmico						
	Condição			% ART		Fermentação		Condição			% ART		Fermentação		Condição		% ART		Fermentação		
	T (min)	C _{ác} (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _b (%)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	T (min)	C _{bio} (%)	PT	HE	η_P (%)	η_f (%)	
1	15	1	1	25,05	4,55	30,31	57,08	15	0,5	1	27,42	6,16	39,76	55,35	15	1	11,47	5,62	24,5	56,8	
2	120	1	1	35,25	4,55	30,31	85,33	120	0,5	1	17,1	6,69	20,57	32,04	15	5	10,67	2,95	47	79,66	
3	15	1	9	4,57	4,02	34,39	73,46	15	0,5	9	4,34	5,62	8,17	17,07	15	9	5,82	2,95	26,11	52,32	
4	120	1	9	22,76	4,55	40,42	76,1	120	0,5	9	4,08	1,07	45,71	78,22	67,5	1	23,67	4,02	19,09	56,98	
5	15	5	1	50,19	6,16	22,37	34,2	15	2,5	1	16,3	1,34	54,85	69,81	67,5	5	18,04	2,95	36,55	95,18	
6	120	5	1	18,69	3,48	61,79	98,8	120	2,5	1	36,9	2,14	35,55	49,4	67,5	9	9,35	2,95	57,44	84,36	
7	15	5	9	23,83	7,76	27,78	40,31	15	2,5	9	27,8	2,41	66,55	96,84	120	1	22,56	2,41	46,91	90,79	
8	120	5	9	28,3	5,62	35,4	61,73	120	2,5	9	5,64	3,75	28,9	81,79	120	5	16,65	2,95	57,44	81,69	
9	67,5	3	5	36,26	4,55	47,16	88,79	67,5	1,5	5	6,25	3,35	68,57	93,86	120	9	9,79	2,95	47	95,95	
10	67,5	3	5	37,82	5,62	29,96	48,25	67,5	1,5	5	8,61	3,48	79,44	98,42							
11	67,5	3	5	32,68	5,09	51,2	74,68	67,5	1,5	5	7,37	3,48	57,37	78,55							

T = tempo C_{ác} = concentração de ácido C_b = concentração de base C_{bio} = concentração de biomassa PT = pré-tratamento HE = hidrólise enzimática

Fonte: Autor, 2014

O pré-tratamento alcalino foi mais eficiente na hidrólise enzimática, devido a menor sacarificação no pré-tratamento. É importante ressaltar que muita sacarificação no pré-tratamento indica grande severidade do processo e que pode levar consigo, além dos açúcares provenientes da hemicelulose e lignina, açúcares provenientes da celulose, resultando em baixas eficiências de hidrólise.

Figura 24: Avaliação das condições limites do planejamento com resíduo de graviola.

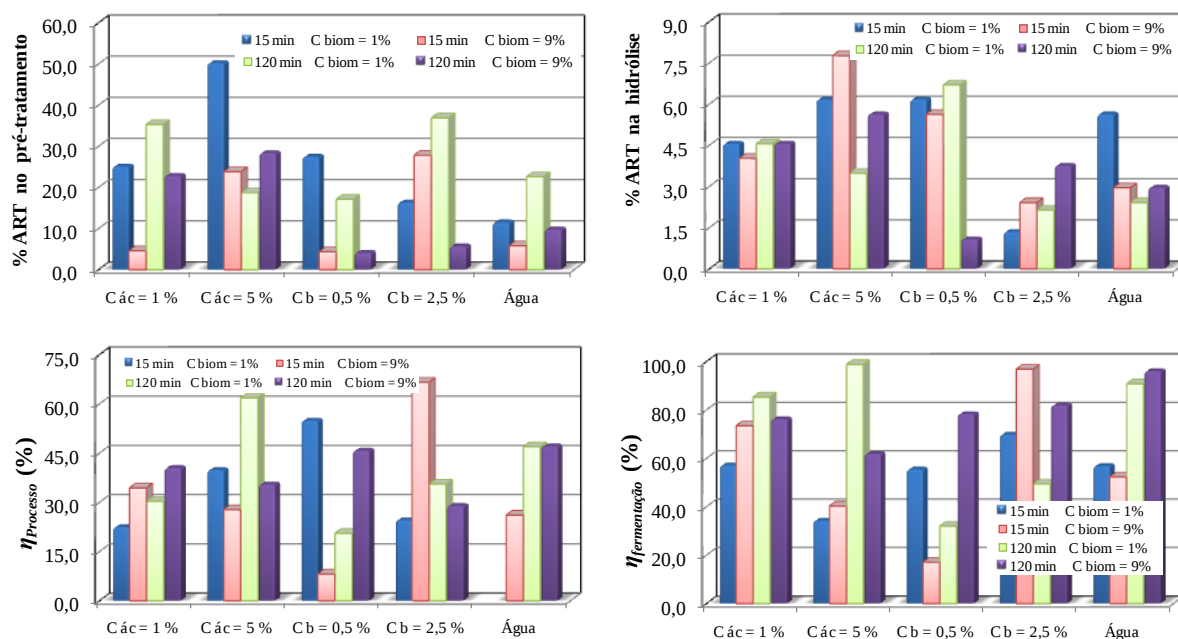


Fonte: Autor, 2014

No pré-tratamento hidrotérmico houve baixa desassimilação de açúcares redutores totais (%ART), tanto no pré-tratamento quanto na hidrólise enzimática. Uma razão que pode estar associada são as condições de tempo e temperatura empregadas, principalmente temperatura (121°C). Estas não foram suficientes para desorganizar a estrutura lignocelulósica das biomassas, de forma a facilitar a etapa de hidrólise, visto que, geralmente, são utilizadas temperaturas mais elevadas (175 a 225°C) (MOSIER et al., 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

Na etapa de fermentação os melhores rendimentos ocorreram para as biomassas tratada com maior tempo e concentração de base, com exceção para o resíduo de graviola que exigiu menor tempo e C_{base} para os melhores rendimentos. Como o processo bioquímico é complexo e para tal discussão se deveria conhecer detalhes da estrutura lignocelulósica do pré-tratado além de análises de cromatografia no hidrolisado para conhecimento dos tipos de açúcares e inibidores presentes.

Figura 25: Avaliação das condições limites do planejamento com resíduo de maracujá.



Fonte: Autor, 2014

Com base nos dados de cada pré-tratamento e resíduo foram avaliadas as superfícies de resposta a partir do gráfico de Pareto, percentual de açúcares redutores totais (%ART) no pré-tratamento, hidrólise enzimática e rendimentos de fermentação (Figuras 26 a 28 e Tabelas 13 a 15, para o bagaço de laranja, resíduo de graviola e casca de maracujá, respectivamente). As variáveis de rendimento mássico (%) e sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}/g_{\text{resíduo}}$) estão com sua análise estatística em anexo (ANEXO I a III), pela dificuldade de alocação e menor significância para o processo de obtenção de etanol 2G.

No pré-tratamento hidrotérmico houve similaridades nas variáveis significativas para os três resíduos. O teor de açúcares (%ART) liberado no licor do pré-tratamento indicou influência negativa da concentração da biomassa, assim como o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}/g_{\text{resíduo}}$). Para o rendimento mássico (%) houve a participação significativa da C_{biomassa} , que atuou positivamente, e do tempo, negativamente. Isto indica que quanto maior a quantidade de biomassa maior será o rendimento mássico, provavelmente pela redução da relação líquido/sólido, que deve influir no sistema catalítico da sacarificação do pré-tratamento. Quanto maior o tempo de aquecimento, menor foi o rendimento mássico, pois ocorreu uma maior solubilização de sólidos.

Figura 26: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com bagaço de laranja.

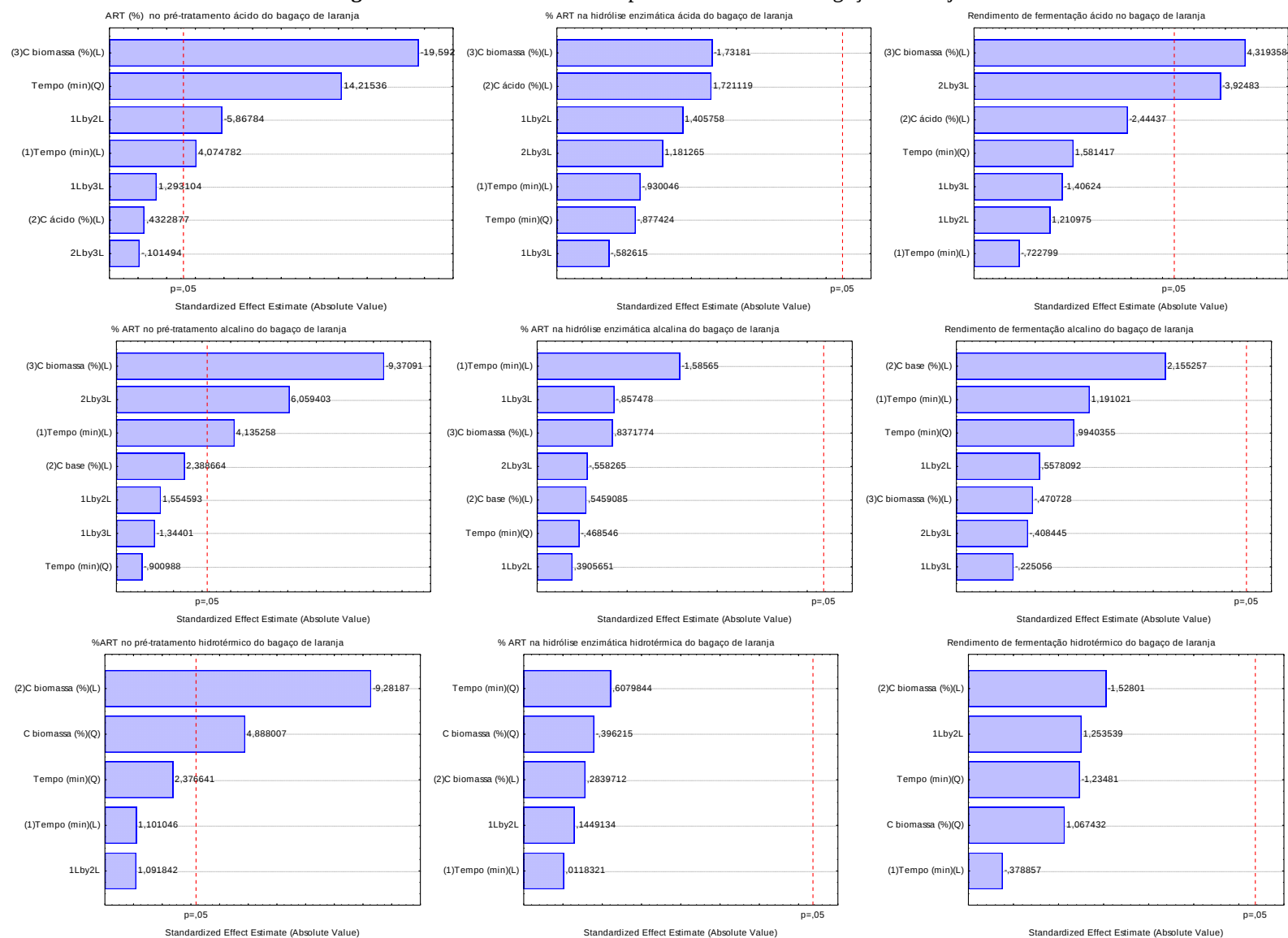


Tabela 13: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com bagaço de laranja.

Bagaço de laranja Tratamento ácido						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)											
ART Pré-tratamento R ² = 0,9953 MS = 3,5385	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	ART Hidrólise R ² = 0,79032 MS = 1,750089	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	Rendimento fermentação R ² = 0,9394 MS = 50,3744	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão
Média/Interação *	28,1267	1,0860	25,8982	0,0001	64,1539	Média/Interação *	7,7833	0,7638	10,1905	0,0020	8,7146	Média/Interação *	16,430	4,098	4,010	0,028	8,698
(1) Tempo (min) (L) *	5,4200	1,3301	4,0748	0,0267	-0,7441	(1) Tempo (min) (L)	-0,8700	0,9354	-0,9300	0,4210	0,0179	(1) Tempo (min) (L)	-3,628	5,019	-0,723	0,522	-0,410
Tempo (min) (Q) *	36,2067	2,5470	14,2154	0,0008	0,0066	Tempo (min) (Q)	-1,5717	1,7912	-0,8774	0,4449	-0,0003	Tempo (min) (Q)	15,198	9,610	1,581	0,212	0,003
(2) C ácido (%) (L)	0,5750	1,3301	0,4323	0,6947	2,6947	(2) C ácido (%) (L)	1,6100	0,9354	1,7211	0,1837	-0,3655	(2) C ácido (%) (L)	-12,268	5,019	-2,444	0,092	1,135
(3) C biomassa (%) (L) *	-26,0600	1,3301	-19,5920	0,0003	-3,5086	(3) C biomassa (%) (L)	-1,6200	0,9354	-1,7318	0,1817	-0,3221	(3) C biomassa (%) (L) *	21,678	5,019	4,319	0,023	7,537
(1) x (2) (L) *	-7,8050	1,3301	-5,8678	0,0099	-0,0372	(1) x (2) (L)	1,3150	0,9354	1,4058	0,2545	0,0063	(1) x (2) (L)	6,078	5,019	1,211	0,313	0,029
(1) x (3) (L)	1,7200	1,3301	1,2931	0,2865	0,0041	(1) x (3) (L)	-0,5450	0,9354	-0,5826	0,6011	-0,0013	(1) x (3) (L)	-7,058	5,019	-1,406	0,254	-0,017
(2) x (3) (L)	-0,1350	1,3301	-0,1015	0,9256	-0,0084	(2) x (3) (L)	1,1050	0,9354	1,1813	0,3226	0,0691	(2) x (3) (L) *	-19,698	5,019	-3,925	0,029	-1,231
Bagaço de laranja Tratamento alcalino						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)											
ART Pré-tratamento R ² = 0,98069 MS = 2,932693	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	ART Hidrólise R ² = 0,62179 MS = 64,18147	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	Rendimento fermentação R ² = 0,72227 MS = 601,3622	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão
Média/Interação *	13,2233	0,9887	13,3742	0,0009	20,5866	Média/Interação *	22,8900	4,6253	4,9488	0,0158	14,4455	Média/Interação	28,5533	14,1582	2,0167	0,1371	19,1805
(1) Tempo (min) (L) *	5,0075	1,2109	4,1353	0,0257	0,0913	(1) Tempo (min) (L)	-8,9825	5,6649	-1,5857	0,2110	0,0651	(1) Tempo (min) (L)	20,6525	17,3402	1,1910	0,3193	-0,7033
Tempo (min) (Q)	-2,0892	2,3188	-0,9010	0,4340	-0,0004	Tempo (min) (Q)	-5,0825	10,8474	-0,4685	0,6713	-0,0009	Tempo (min) (Q)	33,0058	33,2039	0,9940	0,3935	0,0060
(2) C base (%) (L)	2,8925	1,2109	2,3887	0,0969	-4,3499	(2) C base (%) (L)	3,0925	5,6649	0,5459	0,6231	2,1005	(2) C base (%) (L)	37,3725	17,3402	2,1553	0,1201	16,8948
(3) C biomassa (%) (L) *	-11,3475	1,2109	-9,3709	0,0026	-2,5327	(3) C biomassa (%) (L)	4,7425	5,6649	0,8372	0,4639	1,9665	(3) C biomassa (%) (L)	-8,1625	17,3402	-0,4707	0,6699	0,9348
(1) x (2) (L)	1,8825	1,2109	1,5546	0,2179	0,0179	(1) x (2) (L)	2,2125	5,6649	0,3906	0,7222	0,0211	(1) x (2) (L)	9,6725	17,3402	0,5578	0,6159	0,0921
(1) x (3) (L)	-1,6275	1,2109	-1,3440	0,2715	-0,0039	(1) x (3) (L)	-4,8575	5,6649	-0,8575	0,4542	-0,0116	(1) x (3) (L)	-3,9025	17,3402	-0,2251	0,8364	-0,0093
(2) x (3) (L) *	7,3375	1,2109	6,0594	0,0090	0,9172	(2) x (3) (L)	-3,1625	5,6649	-0,5583	0,6156	-0,3953	(2) x (3) (L)	-7,0825	17,3402	-0,4084	0,7104	-0,8853
Bagaço de laranja Tratamento hidrotérmico						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)											
ART Pré-tratamento R ² = 0,97523 MS = 12,98883	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	ART Hidrólise R ² = 0,17319 MS = 17,14293	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão	Rendimento fermentação R ² = 0,69116 MS = 366,2558	Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coefficiente de regressão
Média/Interação	2,9889	2,6863	1,1127	0,3470	50,6145	Média/Interação	9,3433	3,0861	3,0276	0,0564	10,3297	Média/Interação	35,0000	14,2645	2,4536	0,0914	67,9540
(1) Tempo (min) (L)	3,2400	2,9427	1,1010	0,3513	-0,3126	(1) Tempo (min) (L)	0,0400	3,3806	0,0118	0,9913	-0,0939	(1) Tempo (min) (L)	-5,9200	15,6260	-0,3789	0,7300	0,4765
Tempo (min) (Q)	12,1133	5,0968	2,3766	0,0979	0,0022	Tempo (min) (Q)	3,5600	5,8554	0,6080	0,5861	0,0006	Tempo (min) (Q)	-33,4200	27,0650	-1,2348	0,3048	-0,0061
(2) C biomassa (%) (L) *	-27,3133	2,9427	-9,2819	0,0026	-11,8320	(2) C biomassa (%) (L)	0,9600	3,3806	0,2840	0,7949	0,7486	(2) C biomassa (%) (L)	-23,8767	15,6260	-1,5280	0,2240	-15,8682
C biomassa (%) (Q) *	24,9133	5,0968	4,8880	0,0164	0,7785	C biomassa (%) (Q)	-2,3200	5,8554	-0,3962	0,7184	-0,0725	C biomassa (%) (Q)	28,8900	27,0650	1,0674	0,3640	0,9028
(1) x (2) (L)	3,9350	3,6040	1,0918	0,3547	0,0094	(1) x (2) (L)	0,6000	4,1404	0,1449	0,8940	0,0014	(1) x (2) (L)	23,9900	19,1378	1,2535	0,2988	0,0571

Fonte: Autor, 2014

Figura 27: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com resíduo de graviola.

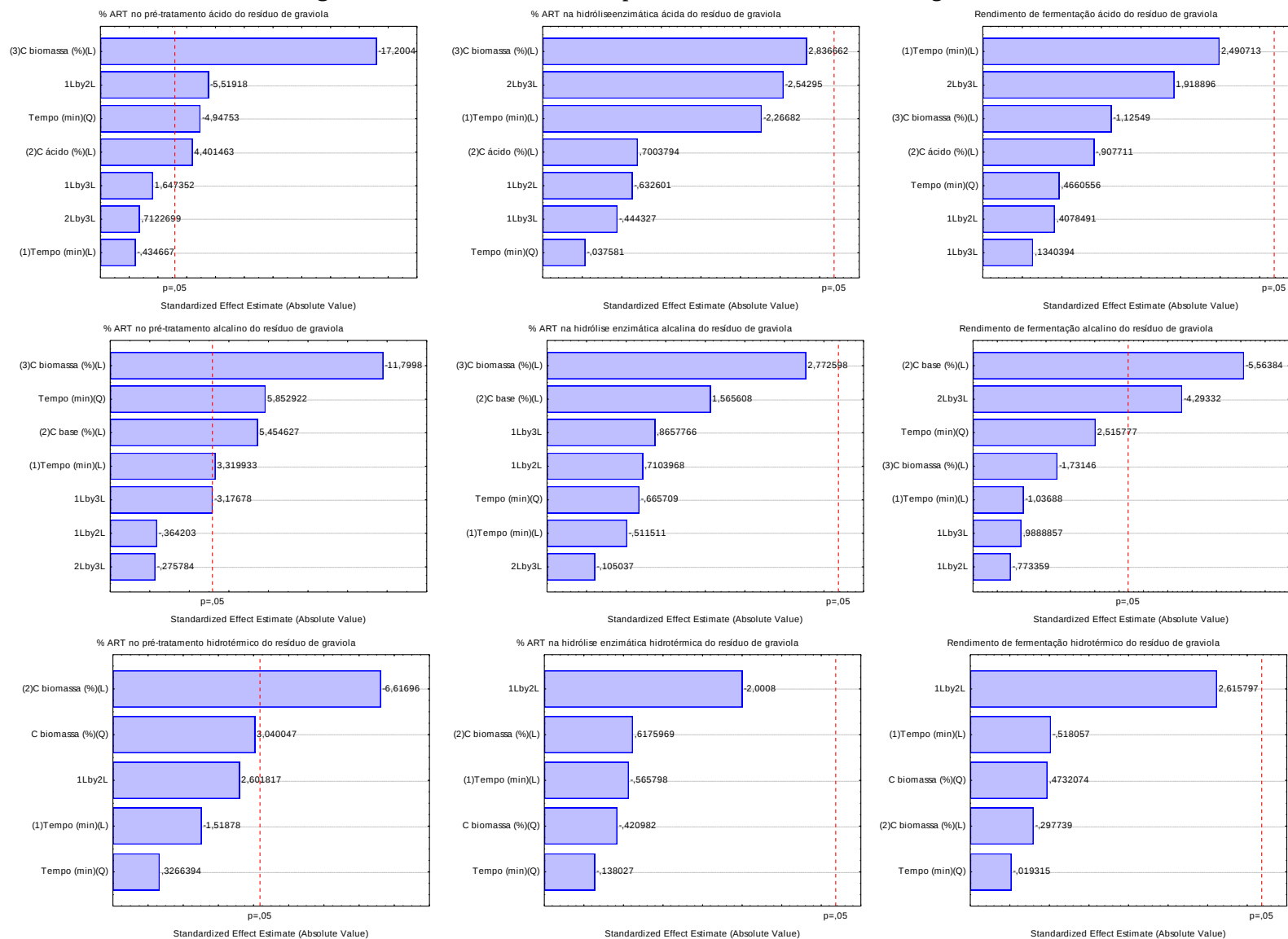


Tabela 14: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com resíduo de graviola.

Resíduo de graviola Tratamento ácido						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)						Resíduo de graviola Tratamento alcalino					
ART Pré-tratamento R ² = 0,99203 MS = 0,9368931						ART Hidrólise R ² = 0,87364 MS = 7,934356						Rendimento fermentação R ² = 0,80492 MS = 123,3131					
Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão	
Média/Interação *	29,4633	0,5588	52,7227	0,0000	27,1141	Média/Interação *	18,0167	1,6263	11,0785	0,0016	9,5486	Média/Interação *	30,3400	6,4113	4,7323	0,0179	52,4880
(1) Tempo (min) (L)	-0,2975	0,6844	-0,4347	0,6932	0,1965	(1) Tempo (min) (L)	-4,5150	1,9918	-2,2668	0,1082	-0,0110	(1) Tempo (min) (L)	19,5575	7,8522	2,4907	0,0884	-0,0436
Tempo (min) (Q) *	-6,4842	1,3106	-4,9475	0,0158	-0,0012	Tempo (min) (Q)	-0,1433	3,8140	-0,0376	0,9724	0,0000	Tempo (min) (Q)	7,0075	15,0358	0,4661	0,6729	0,0013
(2) C ácido (%) (L) *	3,0125	0,6844	4,4015	0,0217	1,8150	(2) C ácido (%) (L)	1,3950	1,9918	0,7004	0,5341	2,3366	(2) C ácido (%) (L)	-7,1275	7,8522	-0,9077	0,4309	-7,5198
(3) C biomassa (%) (L) *	-11,7725	0,6844	-17,2004	0,0004	-1,7442	(3) C biomassa (%) (L)	5,6500	1,9918	2,8367	0,0658	1,7982	(3) C biomassa (%) (L)	-8,8375	7,8522	-1,1255	0,3423	-4,0990
(1) x (2) (L) *	-3,7775	0,6844	-5,5192	0,0117	-0,0180	(1) x (2) (L)	-1,2600	1,9918	-0,6326	0,5719	-0,0060	(1) x (2) (L)	3,2025	7,8522	0,4078	0,7107	0,0153
(1) x (3) (L)	1,1275	0,6844	1,6474	0,1980	0,0027	(1) x (3) (L)	-0,8850	1,9918	-0,4443	0,6869	-0,0021	(1) x (3) (L)	1,0525	7,8522	0,1340	0,9019	0,0025
(2) x (3) (L)	0,4875	0,6844	0,7123	0,5277	0,0305	(2) x (3) (L)	-5,0650	1,9918	-2,5430	0,0845	-0,3166	(2) x (3) (L)	15,0675	7,8522	1,9189	0,1508	0,9417
Resíduo de graviola Tratamento alcalino						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)						Resíduo de graviola Tratamento hidrotérmico					
ART Pré-tratamento R ² = 0,98682 MS = 2,820426						ART Hidrólise R ² = 0,80144 MS = 32,3594						Rendimento fermentação R ² = 0,95339 MS = 60,97097					
Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão	
Média/Interação *	8,0267	0,9696	8,2782	0,0037	16,6368	Média/Interação *	23,7600	3,2843	7,2345	0,0054	14,3090	Média/Interação *	25,4633	4,5082	5,6483	0,0110	58,1896
(1) Tempo (min) (L) *	3,9425	1,1875	3,3199	0,0451	-0,2373	(1) Tempo (min) (L)	-2,0575	4,0224	-0,5115	0,6443	0,0237	(1) Tempo (min) (L)	-5,7250	5,5214	-1,0369	0,3760	-0,7099
Tempo (min) (Q) *	13,3092	2,2739	5,8529	0,0099	0,0024	Tempo (min) (Q)	-5,1275	7,7023	-0,6657	0,5532	-0,0009	Tempo (min) (Q)	26,5983	10,5726	2,5158	0,0865	0,0048
(2) C base (%) (L) *	6,4775	1,1875	5,4546	0,0121	3,7215	(2) C base (%) (L)	6,2975	4,0224	1,5656	0,2154	1,5758	(2) C base (%) (L) *	-30,7200	5,5214	-5,5638	0,0115	2,2006
(3) C biomassa (%) (L) *	-14,0125	1,1875	-11,7998	0,0013	-1,0839	(3) C biomassa (%) (L)	11,1525	4,0224	2,7726	0,0694	0,9136	(3) C biomassa (%) (L)	-9,5600	5,5214	-1,7315	0,1818	2,3722
(1) x (2) (L)	-0,4325	1,1875	-0,3642	0,7399	-0,0041	(1) x (2) (L)	2,8575	4,0224	0,7104	0,5287	0,0272	(1) x (2) (L)	-4,2700	5,5214	-0,7734	0,4957	-0,0407
(1) x (3) (L)	-3,7725	1,1875	-3,1768	0,0502	-0,0090	(1) x (3) (L)	3,4825	4,0224	0,8658	0,4503	0,0083	(1) x (3) (L)	5,4600	5,5214	0,9889	0,3956	0,0130
(2) x (3) (L)	-0,3275	1,1875	-0,2758	0,8006	-0,0409	(2) x (3) (L)	-0,4225	4,0224	-0,1050	0,9230	-0,0528	(2) x (3) (L) *	-23,7050	5,5214	-4,2933	0,0232	-2,9631
Resíduo de graviola Tratamento hidrotérmico						* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)						Resíduo de graviola Tratamento hidrotérmico					
ART Pré-tratamento R ² = 0,95399 MS = 6,562162						ART Hidrólise R ² = 0,6203 MS = 1,049789						Rendimento fermentação R ² = 0,71219 MS = 72,97141					
Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão	
Média/Interação *	7,2989	1,9094	3,8227	0,0315	32,9291	Média/Interação *	9,2833	0,7637	12,1560	0,0012	6,9755	Média/Interação *	35,5711	6,3671	5,5867	0,0113	61,4210
(1) Tempo (min) (L)	-3,1767	2,0916	-1,5188	0,2261	-0,1386	(1) Tempo (min) (L)	-0,4733	0,8366	-0,5658	0,6111	0,0248	(1) Tempo (min) (L)	-3,6133	6,9748	-0,5181	0,6402	-0,2947
Tempo (min) (Q)	1,1833	3,6228	0,3266	0,7654	0,0002	Tempo (min) (Q)	-0,2000	1,4490	-0,1380	0,8990	0,0000	Tempo (min) (Q)	-0,2333	12,0807	-0,0193	0,9858	0,0000
(2) C biomassa (%) (L) *	-13,8400	2,0916	-6,6170	0,0070	-6,2428	(2) C biomassa (%) (L)	0,5167	0,8366	0,6176	0,5806	0,5847	(2) C biomassa (%) (L)	-2,0767	6,9748	-0,2977	0,7853	-5,6372
C biomassa (%) (Q)	11,0133	3,6228	3,0400	0,0559	0,3442	C biomassa (%) (Q)	-0,6100	1,4490	-0,4210	0,7021	-0,0191	C biomassa (%) (Q)	5,7167	12,0807	0,4732	0,6684	0,1786
(1) x (2) (L)	6,6650	2,5617	2,6018	0,0802	0,0159	(1) x (2) (L)	-2,0500	1,0246	-2,0008	0,1392	-0,0049	(1) x (2) (L)	22,3450	8,5423	2,6158	0,0793	0,0532

Fonte: Autor, 2014

Figura 28: Análise de Pareto nos pré-tratamentos com resíduo de maracujá.

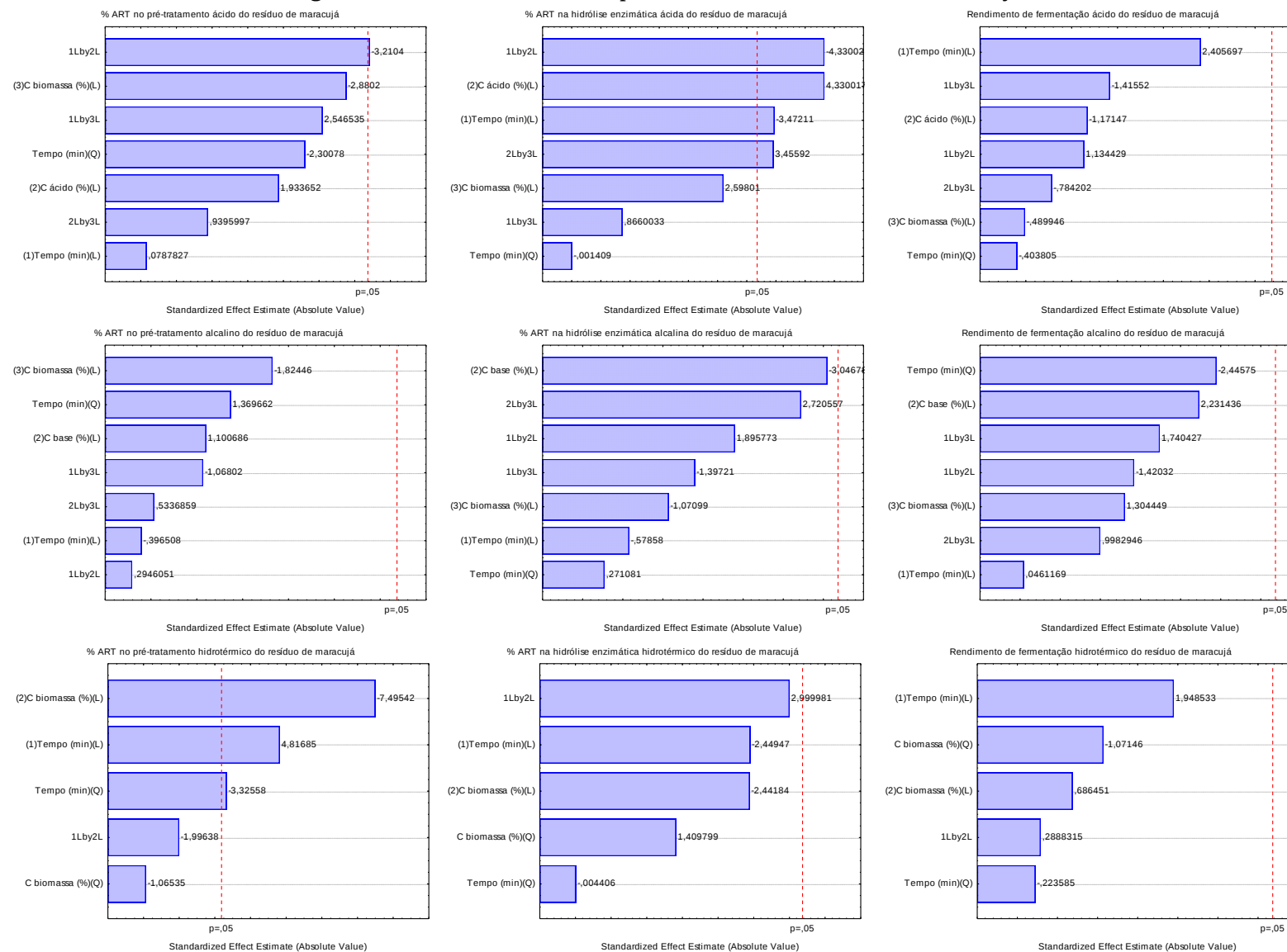


Tabela 15: Análise de variância para o pré-tratamento, hidrólise e rendimento de fermentação com resíduo de maracujá.

Resíduo de maracujá Tratamento ácido						Resíduo de maracujá Tratamento alcalino						Resíduo de maracujá Tratamento hidrotérmico					
ART Pré-tratamento R ² = 0,92107 MS = 37,24997						ART Hidrólise R ² = 0,95833 MS = 0,1908264						ART Hidrólise R ² = 0,88439 MS = 0,2862287					
Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão	
Média/Interação *	35,5867	3,5237	10,0992	0,0021	20,4356	Média/Interação *	5,0867	0,2522	20,1686	0,0003	4,1968	Média/Interação *	2,9511	0,3988	7,4006	0,0051	6,4259
(1) Tempo (min) (L)	0,3400	4,3157	0,0788	0,9422	0,5360	(1) Tempo (min) (L)*	-1,0725	0,3089	-3,4721	0,0403	0,0057	(1) Tempo (min) (L)	-1,0700	0,4368	-2,4495	0,0917	-0,0292
Tempo (min) (Q)	-19,0133	8,2639	-2,3008	0,1049	-0,0034	Tempo (min) (Q)	-0,0008	0,5915	-0,0014	0,9990	0,0000	Tempo (min) (Q)	-0,0033	0,7566	-0,0044	0,9968	0,0000
(2) C ácido (%) (L)	8,3450	4,3157	1,9337	0,1486	5,2725	(2) C ácido (%) (L) *	1,3375	0,3089	4,3300	0,0227	0,4307	(2) C biomassa (%) (L)	-1,0667	0,4368	-2,4418	0,0923	-0,7246
(3) C biomassa (%) (L)	-12,4300	4,3157	-2,8802	0,0635	-4,0803	(3) C biomassa (%) (L)	0,8025	0,3089	2,5980	0,0805	-0,1428	C biomassa (%) (Q)	1,0667	0,7566	1,4098	0,2534	0,0333
(1) x (2) (L) *	-13,8550	4,3157	-3,2104	0,0489	-0,0660	(1) x (2) (L) *	-1,3375	0,3089	-4,3300	0,0227	-0,0064	(1) x (2) (L)	1,6050	0,5350	3,0000	0,0577	0,0038
(1) x (3) (L)	10,9900	4,3157	2,5465	0,0842	0,0262	(1) x (3) (L)	0,2675	0,3089	0,8660	0,4502	0,0006						
(2) x (3) (L)	4,0550	4,3157	0,9396	0,4167	0,2534	(2) x (3) (L) *	1,0675	0,3089	3,4559	0,0408	0,0667						
Rendimento fermentação R ² = 0,79265 MS = 295,2103						Rendimento fermentação R ² = 0,8618 MS = 332,9234						Rendimento fermentação R ² = 0,6491 MS = 278,487					
Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão		Efeito	Erro padrão	t(3)	p	Coeficiente de regressão	
Média/Interação *	70,5733	9,9199	7,1144	0,0057	48,9532	Média/Interação *	90,2767	10,5344	8,5697	0,0033	20,2898	Média/Interação *	87,2689	12,4384	7,0161	0,0059	44,1119
(1) Tempo (min) (L)	29,2275	12,1493	2,4057	0,0954	0,5163	(1) Tempo (min) (L)	0,5950	12,9020	0,0461	0,9661	1,4799	(1) Tempo (min) (L)	26,5500	13,6256	1,9485	0,1465	0,3247
Tempo (min) (Q)	-9,3942	23,2641	-0,4038	0,7134	-0,0017	Tempo (min) (Q)	-60,4233	24,7055	-2,4457	0,0920	-0,0110	Tempo (min) (Q)	-5,2767	23,6003	-0,2236	0,8374	-0,0010
(2) C ácido (%) (L)	-14,2325	12,1493	-1,1715	0,3260	-5,0109	(2) C base (%) (L)	28,7900	12,9020	2,2314	0,1118	18,1254	(2) C biomassa (%) (L)	9,3533	13,6256	0,6865	0,5417	8,2966
(3) C biomassa (%) (L)	-5,9525	12,1493	-0,4899	0,6578	3,8062	(3) C biomassa (%) (L)	16,8300	12,9020	1,3044	0,2831	-3,9201	C biomassa (%) (Q)	-25,2867	23,6003	-1,0715	0,3625	-0,7902
(1) x (2) (L)	13,7825	12,1493	1,1344	0,3391	0,0656	(1) x (2) (L)	-18,3250	12,9020	-1,4203	0,2506	-0,1745	(1) x (2) (L)	4,8200	16,6879	0,2888	0,7915	0,0115
(1) x (3) (L)	-17,1975	12,1493	-1,4155	0,2519	-0,0409	(1) x (3) (L)	22,4550	12,9020	1,7404	0,1802	0,0535						
(2) x (3) (L)	-9,5275	12,1493	-0,7842	0,4901	-0,5955	(2) x (3) (L)	12,8800	12,9020	0,9983	0,3917	1,6100						

Fonte: Autor, 2014

Para o pré-tratamento ácido, a desassimilação de açúcares (%ART) no licor do pré-tratamento obteve melhores resultados nos limites inferiores do tempo (Q) e a C_{biomassa} (1% de biomassa e 15 min de aquecimento), assim como a interação tempo (L) x $C_{\text{ácido}}$. Para o rendimento mássico (%), o aumento do tempo (L) diminui o rendimento massico, fato também ocorrido no pré-tratamento hidrotérmico. O teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix/g}_{\text{resíduo}}$) indicou que o aumento da C_{biomassa} , da interação $C_{\text{ácido}} \times C_{\text{biomassa}}$ e do tempo (Q) diminuiram a quantidade de sólidos solubilizados no licor, entretanto para $C_{\text{ácido}}$ e tempo (L), aumentaram. Percebeu-se que a solubilização de sólidos foi maior utilizando-se maiores valores de $C_{\text{ácido}}$ e do tempo enquanto que o aumento da C_{biomassa} dificultou a solubilização, provavelmente pelos mesmos motivos já explicados nas visualizações dos resultados (diminuição da relação líquido/sólido, facilidade da hidrólise em meio ácido e aquecimento dos açúcares, maior tempo de aquecimento e maior desagregação da biomassa).

As diferenças encontradas na desassimilação de açúcares, como o tempo (L) e tempo (Q) para o bagaço de laranja e resíduo de graviola, e $C_{\text{ácido}}$ para resíduo de graviola, sugerem dependência da própria composição dos resíduos (variável) e, para o maracujá, nenhuma além das mencionadas. A solubilização dos sólidos da biomassa possuiu os mesmos fatores significativos, enquanto que para o %ART no licor do pré-tratamento, não.

Para a hidrólise enzimática, o aumento da $C_{\text{ácido}}$ ofereceu influência positiva para o bagaço de laranja e para a casca de maracujá, significância essa que pode ser atrelada à pectina, constituinte de elevado valor nesses dois resíduos e que se solubiliza em meio ácido (GROHMANN et al., 1995). Para a casca do maracujá, o aumento do tempo não melhorou significativamente os resultados, sugerindo um tempo longo para pré-tratamento. Para as fermentações, não houve significância de nenhum dos fatores.

Na sacarificação do pré-tratamento alcalino (%ART) houvera influências similares à concentração de base e ao tempo, possuindo maiores valores com o aumento desses parâmetros. Quanto à C_{biomassa} , para o resíduo de graviola, seu aumento foi positivo, mas para o bagaço de laranja e casca de maracujá foi negativa, em razão da formação da goma, associada à pectina, polímero em maior quantidade nesses dois últimos resíduos (bagaço de laranja e casca do maracujá).

Maiores valores de C_{base} e tempo diminuiram o rendimento mássico (%) para os três resíduos. Já na solubilização de sólidos, maior C_{base} foi positiva, enquanto que menor C_{biomassa} foram melhor aplicáveis aos resíduos de graviola e casca de maracujá, e maiores no bagaço de laranja. A hidrólise enzimática e fermentação não apresentam significância nestes fatores.

Esses resultados, principalmente as divergências das cascas de maracujá, resíduo com

a maior concentração de pectina dentre os estudados, corroboram a hipótese de que a presença da pectina atrapalha o processo de pré-tratamento e hidrólise, recomendando-se uma abordagem mais detalhada de sua presença, além da necessidade de utilização de pectinases como feito por Grohmann (1995) e Choi et al. (2012). Widmen et al. (2010) verificaram que, com o pré-tratamento ácido a 160°C, cerca de 70% da pectina foi solubilizada, enquanto que no pré-tratamento básico ela foi rapidamente destruída. Uma alternativa seria a extração da pectina utilizando ácidos naturais, como o cítrico, visando a utilização na indústria de alimentos, e posterior produção de etanol 2G.

5.6. Cálculos de viabilidade de produção

Utilizando-se os dados apresentados na revisão bibliográfica e metodologia, a umidade do resíduo (Tabela 10) e as conversões máximas mostradas na Tabela 12, sendo a conversão em etanol utilizada a teórica formulada por Gay-Lussac, onde 1 molécula de glicose é convertida a 2 de etanol (51,1% em massa), pode-se calcular a viabilidade teórica de produção de etanol a partir dos resíduos, como mostra a Tabela 16.

Tabela 16: Viabilidade de uso do resíduo de graviola na produção de etanol.

Resíduo	Pré-Tratamento	Produção de fruta (mil t)	Produção de resíduo (mil t)	Produção em matéria seca (mil t)	X_{ART} (%)	m_{ART} (mil t)	m_{ETANOL} (mil t)	V_{ETANOL} (mil m ³)
Laranja	Ácido	47000	23500	6345	65,76	4172,472	2132,13	2702,32
	Alcalino				39,35	2496,7575	1275,84	1617,04
	Hidrotérmico				45,76	2903,472	1483,67	1880,45
Graviola	Ácido	20	10	1,8	58,16	1,04688	0,53	0,68
	Alcalino				44,81	0,80658	0,41	0,52
	Hidrotérmico				34,96	0,62928	0,32	0,41
Maracujá	Ácido	920	368	73,6	56,35	41,4736	21,19	26,86
	Alcalino				39,04	28,73344	14,68	18,61
	Hidrotérmico				27,69	20,37984	10,41	13,20

Fonte: Autor (2014).

Observaram-se bons volumes na obtenção de etanol a partir dos sacarificados nos processos de pré-tratamento estudados. Os melhores valores foram encontrados no pré-tratamento ácido, em função dos elevados teores de açúcares no licor do pré-tratamento,

embora as melhores taxas de hidrólise enzimática tenham sido com o pré-tratamento alcalino. Vale salientar que na metodologia de cálculo foram considerados todos os açúcares, ou seja, pentoses e hexoses, ainda que a pentose não seja fermentada pela levedura *S. cerevisiae*.

O uso destes tipos de substratos representa um ganho econômico devido ao baixo custo de obtenção da matéria-prima, agregando valor ao resíduo gerado após a extração da polpa/suco na unidade produtora, além de solucionar a questão do descarte inadequado, representando, também, um ganho ambiental.

A partir dos resultados obtidos e calculados, encontra-se a partir dos resíduos e das conversões teóricas dos açúcares solubilizados nos pré-tratamentos valores 67 a 115 L de etanol/ tonelada de resíduo úmido para o pré-tratamento ácido, de 51 a 69 L de etanol/tonelada de resíduo úmido para o alcalino e 36 a 80 L de etanol/tonelada de resíduo úmido para o hidrotérmico. Quando comparados à cana-de-açúcar, que possui um rendimento teórico de cerca 85 L de etanol/tonelada de cana (caldo) e 40 L de etanol/tonelada de cana (bagaço) (SANTOS et al., 2012), algumas condições, em especial as com ácidos diluídos, poderiam alcançar valores maiores, ou próximos dos 120 teóricos.

No entanto, cabe ressaltar que as conversões em açúcares não foram baseadas na estrutura lignocelulósica dos resíduos, mas sim na quantidade de açúcares solubilizados, muitos dos quais com hidrólise enzimática ineficiente, degradação de açúcares acentuada e quantidade de pectina atrapalhando, visivelmente, no resíduo do maracujá. Portanto, para um início de estudo e triagem de uma rota de processo mais adequada a esse tipo de resíduo, alcançando elevados teores de sacarificação, necessita-se de otimizações.

5. CONCLUSÕES

Os resíduos apresentaram elevado teor de carboidratos após a caracterização físico-química, em torno de 70%.

Durante o pré-tratamento ácido, os açúcares liberados variaram entre 25 e 65% para o bagaço de laranja, 5 a 50% para o resíduo de maracujá e de 15 a 35% para o resíduo de graviola, sendo os maiores valores encontrados nos experimentos com maior tempo de pré-tratamento. Para o rendimento mássico, alcançaram-se valores médios de 60% para o resíduo de graviola e 40% para o bagaço de laranja e resíduo de maracujá, sem muita flutuação entre os ensaios do mesmo resíduo, o que pode indicar que a diferença nos açúcares solubilizados na fração líquida desta etapa podem ter se degradado nas condições mais severas utilizadas, onde apresentaram menores teores de açúcares.

No tratamento alcalino, os rendimentos mássicos se situaram entre 30 e 50%, exceção para os ensaios 3 e 4 do bagaço de laranja e resíduo de maracujá, os quais foram realizados com menor tempo de aquecimento (15 min), deixando a biomassa com um aspecto de goma e dificultando a solubilização dos açúcares. A sacarificação também se apresentou menor que a do pré-tratamento ácido (5 a 35%), mas houve um menor rendimento mássico, indicando que outro componente da parede do vegetal, provavelmente a lignina, foi solubilizada, fato característico de processos alcalinos.

Observou-se no pré-tratamento hidrotérmico elevados teores de sacarificação nas menores concentrações de biomassa e diminuição drástica nas maiores concentrações. No entanto, os rendimentos mássicos se mantiveram em torno de 50% para resíduo de laranja e cascas de maracujá e 70% para o de graviola, com pouca variação, indicando degradação dos açúcares.

Durante a hidrólise enzimática, o pré-tratamento alcalino se mostrou mais efetivo que o ácido, alcançando valores de 35%, com o pré-tratado de laranja, e de 25% no de graviola. Todavia, para resíduo do maracujá, não houve mais que 10% de desassimilação enzimática em ambos os pré-tratamentos. No pré-tratado hidrotérmico foram obtidas as menores taxas de hidrólise, provavelmente porque não foi eficiente na desorganização da estrutura lignocelulósica, pois foram utilizadas temperaturas menores que as comumente estudadas (175 a 225°C). As baixas taxas de hidrólise podem, também, ser devido à baixa atividade enzimática do complexo utilizado, inferior a 5 FPU/mL para celulasas totais, quando geralmente são utilizadas entre 15 e 25 FPU/mL.

Percebeu-se que o rendimento de fermentação comportou-se de modo diverso entre os ensaios. Para o pré-tratamento ácido, os ensaios com menor tempo (15 min) geraram maiores taxas de rendimento de fermentação, enquanto que para o alcalino e hidrotérmico, os mesmos se situaram em maiores tempos de pré-tratamento (67,5 e 120 min), provavelmente por exigência reacional para a retirada de lignina (alcalino) e quebra da estrutura lignocelulósica (hidrotérmico).

De uma forma global, percebeu-se que no licor do pré-tratamento foram sacarificados mais açúcares que na hidrólise enzimática, possivelmente pela severidade das condições utilizadas, fato este positivo, pois o objetivo do trabalho foi o de avaliar o comportamento desses resíduos frente a diversos fatores de severidade, fornecendo uma triagem para futuras otimizações, seja utilizando menor tempo ou concentração de ácido ou base, maior temperatura (hidrotérmico) ou complexos enzimáticos mais eficientes. A pectina pareceu exercer papel negativo para a hidrólise enzimática, altamente perceptível com o resíduo de maracujá.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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;
- uso de outros complexos enzimáticos e/ou remoção de pectina para verificar sua influência no processo de hidrólise enzimática;
- estudo da carga de sólido na hidrólise enzimática, visto que nesse estudo ela foi reduzida;
- detalhamento de etapas de fermentação e utilização de cepas que fermentem tanto hexoses quanto pentoses;
- análises matemáticas com os resultados obtidos visando verificar a dependência do tipo de processo e variáveis analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ACTION. Teste de Tukey. **Portal Action**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/content/31-teste-de-tukey>>. Acesso em: 01 ago. 2014.
- ABIR. Crescimento do consumo de sucos no Brasil. **Associação Brasileira de Refrigerantes e Bebidas Não-alcoólicas** (2010). Disponível em: <<http://abir.org.br/>> Acesso em: 05 jun. 2014.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.675–685, 2011.
- AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética de desativação celulósica. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 385–391, 2011.
- AMARO, P. A.; MONTEIRO, M. Cultivo orgânico e convencional em relação à cor da casca. **Alimentos e Nutrição**, Sao Paulo, v. 12, p. 171–184, 2001.
- ANDERSON J. W., BAIRD P., DAVIS R. JR., FERRERI S., KNUDTSON M., KORAYM A., WATERS V., WILLIAM, S.C.L. Health benefits of dietary fibers. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 4, p. 188-205, 2009.
- ANDRIGUETO, J. R.; NASSER, L. C. B.; TEIXEIRA, J. M. A. Produção integrada de frutas: conceito, histórico e a evolução para o sistema agropecuário de produção integrada - SAPI. **Portal Agricultura**. Disponível em: < www.agricultura.gov.br >. Acesso em: 12 mar. 2013.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e B combustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**, 2009.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Gaithersburg: Ed. William Horwitz, 2002.
- ARAÚJO, F. P. de. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro**. Tese (Doutorado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 94 f., 2007.
- ARAÚJO, J. L. P.; ARAÚJO, E. P.; CORREIA, R. C. **Análise do custo de produção e rentabilidade do maracujá explorado na região do submédio do São Francisco**. Petrolina - PE: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1808-9984. (Comunicado Técnico 122). 2005.
- ARTEAGA, G. E., LI-CHAN, E., VASQUEZ-ARTEAGA, M. C., NAKAI, S.. Systematic experimental designs for product formula optimization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 243–254, 1994.

BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M.; ZACCHI, G. Direct Catalytic Hydrogenation of Bioethanol-from-Sugarcane Bagasse Effluents over Ru/C Catalyst: An Eco-Efficient Environmentally-Friendly Approach. In: **XX Simpósio Ibero-Americano de Catálise**, Gramado/ RS. Anais XX SICAT. 2006.

BERNARDI, J. V. E.; FOWLER, H. G.; LANDIM, P. M. B. Um estudo de impacto ambiental utilizando análises estatísticas espacial e multivariada. **Holos Environmental**, v.1: p. 162-172. 2001.

BNDS – **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro, 2008, 316p.

BOGAS, A. C. **Clonagem e expressão do gene da b-glicosidase da bactéria endofítica *Bacillus pumilus*.** 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. 2005.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar.** Dissertação (Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, 76f., 2011.

BOX, G. E. P., DRAPER, N. R. **Empirical Model-Building and Response Surfaces.** Hardcover Edition, John Wiley & Sons, New York, 1987.

BP GLOBAL – **BP Statistical Review of World Energy**, 2011 - Disponível em: <www.bp.com>. Acesso em: 05 Jan. 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557–577, 2010.

BUENO, S. M.; LOPES, M. R.V.; GRACIANO, R. A. S.; FERNANDES, E. C. B.; GARCIA-CRUZ, C.H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 121-126, 2002.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado.** Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Apostila, 2001.

CAPEK-MENARD, E.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. Pretreatment of waste paper for increased ethanol yields. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 10, p. 985-988, 1992.

CARVALHO, H. H., JOMG, E. V., BELLÓ, R. M., TERRA, M. F. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análises.** 1.ed. Porto alegre: Universidade/UFRGS, 2002. 180p.

CASTRO, A. M. ; PEREIRA Jr., N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol. 33, Nº 01, S1-S5, 2010.

CGEE. **Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual.** Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n.3, p. 126-131, 2008.

CHOI, I. S.; KIM, J.; WI, S. G.; KIM, K. H. e BAE, H. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. **Applied Energy**, v. 102, p. 204-210, 2013.

CITRUSBR. O retrato da Citricultura Brasileira (2010). **Portal CITRUSBR**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/>> Acesso em: 13 mar. 2014.

CLEMENTE, E., FLORES, C. A., ROSA F. L. I.C., OLIVEIRA M. D., Características da farinha de residuo do processamento da laranja. **Revista Ciencias Exatas e Naturais**, v.14,n.2,Jul/Dez, 2002.

CORTEZ, L. A. B., **Bioetanol de cana-de-açúcar**. Ed. Blucher, 992p, 2010.

COSTA, M. Agronegócio: O motor da economia brasileira e o dinamismo da economia paranaense. **Portal Agronline**, 2006. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/agronegocio-motor-economia-brasileira-dinamismo-economia-paranaense>> Acesso em: 09 ago. 2014.

CYSNE, J. R. B., **Valor Nutritivo de Silagens de Capim Elefante (*Pennisetum Purpureum* Schum.) Com Níveis Crescentes de Adição do Subproduto da Graviola (*Anona Muricata* L.)**. Monografia (Estágio em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 28f., 2004.

DANTAS,R.L et al. Perfil da Qualidade de Polpas de Frutas Comercializadas na Cidade de Campina Grande/PB. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.5, p. 61-66, 2010.

DILLON, A., Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto, Legis Summa, p. 243-270, 2004.

EMBRAPA. **Perfil tecnológico e qualitativo das unidades produtoras de polpa do Estado de Alagoas**. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT) n. 45, p. 1-4., dez., 1998.

EMBRAPA. **Diálogo, conhecimento e articulação fazem renascer maracujá no Rio de Janeiro**.Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2012.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. Balanço Energético Nacional – 2013 Relatório Síntese – Ano Base 2012. Disponível em <www.epe.gov.br> Acesso em: 4 Ago. 2014.

FARIAS, R. O.; SILVA, C. E. F.; ABUD, A. K. S. Análise de componentes principais (ACP) em resíduos da indústria de processamento de frutas. In: **Congresso de Educação, Ciência e Tecnologia**, VI CONECTE. Maceió/AL. Anais: VI CONECTE, 2013.

FILHO, L. C. G. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville – Univille. 2011.

GEDDES, G. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opnion in Biotechnology**, v. 22, p. 312-319, 2011.

GROHMANN K., CAMERON G. R., BUSLIG S. B. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, 54, 129-141, 1995.

GHOSE, T. K.. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.55, n.4, p.295-334, 1995.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, C. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.4, p. 852 – 827, out-dez, 2005.

HAMELINK, C. N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 304-309, 2011.

HEITZ, M.; CAPER-MENARDE, E.; KOEBERLE, P. G.; GAGNE, J.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P.; TAYLOR, J. D.; YU, E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment condition using the stake II technology. **Bioresource Technology**, v. 35, p.23-32, 1991.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HO, S.; HUANG, S.; CHEN, C.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

HOUREDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides-III: Molecular size of heterogeneous pectin chain. Calibration and application of SEC to pectin analysis. **Carbohydrate Polymers**, v.16, p. 409, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro Geográfico. Indicadores agropecuários (2012). **Portal do IBGE**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 12 fev. 14.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p, 2005.

IEA, International Energy Agency (2008). **Portal do IEA**. Disponível em:<<http://www.geografiaparatodos.com.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p.215-223, 2004.

IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Estratégia com biocombustíveis. *Notícias*, 28 jun. 2012. Disponível em: <http://www.ipt.br/noticias_interna.php?id_noticia=530> Acesso em: 12 set. 2014.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 186-193, 2011.

JORDAN, D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, J. A.; WAGSCHAW, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, p. 241-252, 2012.

JORNAL GRANDE BAHIA (2010). Bahia aumenta a área plantada com graviola. **Portal GRANDE BAHIA**. Disponível em: <<http://www.jornalgrandebahia.com.br/2010/05/bahia-aumenta-a-area-plantada-com-graviola.html>> Acesso em: 02 ago. 14.

KIM S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 583-591, 2006.

KLIEMANN E. **Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2006.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LACERDA, M. A. D.; LACERDA, R. D.; ASSIS, P. C. O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, 1º semestre de 2004. ISSN: 1519-5228.

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

LEMOS, E. E. P. O cultivo de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.36, edição especial, p. 077-085, Jan - 2014.

LENNARTSSON, P. R; YLITERVO, P.; LARSSON, C., EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Growth tolerance of zygomycetes *Mucor indicus* in orange peel hydrolysate without detoxification. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 836-842, 2012.

LOHRASBI M.; POURBAFRANI M.; NIKLASSON C.; TAHERZADEH, M. J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7382-7388, 2010.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo. Edgard Blucher, v.3, 2001.

LIMA, M. A. C. de. O cultivo da graviola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3. 2004.

LYND, L. R.; WEIMER, P. L.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R, S.. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020". **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p.582-595. 2008.

MACEDO, A. L.; SANTOS, R. S.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 01, p. 9-15, Jan - Mar, 2011.

MARINELLI, P. S.; DORTA, C.; MILLER, F.; CALDEIRAO, L. Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da casca de laranja e bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Analytica** (São Paulo), v. 10, p. 50, 2012.

MATTIETTO, R. A.; SOARES, M. S.; RIBEIRO, C. C. Caracterização física e físico-química do fruto de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) provenientes de Belém-PA. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM.

MENEGOTO, J.C. **Estudo da viabilidade econômico-financeira para a implantação de maracujá azedo irrigado em sistema adensado de plantio no Distrito Federal**. UPIS – Faculdades Integradas – Departamento de Agronomia. Planaltina, 2008.

MERCADO DO CACAU. Exportações de polpa voltam a ter crescimento no país. **Portal Mercado do Cacau**. Disponível em: <<http://www.mercadodocacau.com/noticia/24432/exportacao-de-polpas-volta-a-ter-crescimento-no-pais.html>> Acesso em: 09 ago. 2014.

MILANEZ, A. Y.; NIKO, D.; GARCIA, L. J. F.; XAVIER, C. E. O. Logística para o etanol: situação atual e desafios futuros. **BNDES Setorial**, v. 31, p. 49-98, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHNEN D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

MORAES, I. V. M. **Produção de Polpa de Fruta Congelada e Suco de Fruta**. Dossiê Técnico. REDETEC (SBRT – Serviço Brasileiro de Normas Técnicas) – Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2006.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n.6, p. 673 – 686, 2005.

NAZARE, R.F.R. **Produtos agroindustriais de bacuri, cupuaçu, graviola e açaí desenvolvidas pela EMBRAPA Amazônia Oriental**. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, 2000.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C.; MAIA, M. L. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 2, p.51-54, 2005.

NOVACANA. Propriedades físico-químicas do etanol. **Portal NOVACANA**. Disponível em: < www.novacana.com/etanol/propriedades-fisico-quimicas > Acesso em 12 set. 2014.

NOVOZYMES. The future of biofuels industry. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/Pages>> Acesso em: 12 set. 2014.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção de etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez., 2013.

OLIVEIRA, E.M.S.; REGIS, S.A.; RESENDE, E. Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá amarelo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 275 - 730, abr., 2011.

OLIVEIRA, V. M. F. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2012.

OVEREND, R. P.; CHORNET E. Fractionation of lignocellulosics by steam-pretreatments. Philosophical Transactions for the Royal Society of London. Series A, **Mathematical and Physical Science Philos.**, v. 321. p. 523-536, 1987.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA A.; SILVA, N. C. e WOSIACKI G. Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, nov./dez., 2005.

PEREIRA, L. G. R.; BARREIROS, D. C.; OLIVEIRA, L. S.; FERREIRA, A. L.; MAURICIO, R. M.; AZEVEDO, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. P.; SOUSA, L. F.; CRUZ, P. G. Composição química e cinética de fermentação ruminal de subprodutos de frutas no sul da Bahia - Brasil. **Live stock Research for Rural Development**, v. 20, n. 1, 2008.

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

PITARELO A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise e enzimática**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 125f., 2007.

RETORE, M.; SILVA, L. P.; TOLEDO, G. S. P; ARAUJO, I. G. Efeito da fibra de co-produtos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.5, p. 1232-1240, 2010.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, K; Proposições para Valorização de Resíduos do Processamento do Suco de Laranja. In: **Internacional Workshop Advances in Cleaner Production**, 2, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, 2007. 325 p.

- RODRIGUES, D. C. G. A.; SANTOS, T. T. **Manual de Práticas de Processos Bioquímicos**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 40 p. Rio de Janeiro, ago. 2011.
- RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.143-152, 2004.
- ROGERIO, M. C. P.; COSTA, H. H. A.; XIMENES, L. I. F.; NEIVA, J. N. M. Produção de bovinos no nordeste do Brasil: desafios e resultados. Banco do Nordeste do Brasil, **Série BNB Ciência e Tecnologia**, 9; XIMENES, L.I.F. (Coord.), p. 263;297, 2011.
- ROSSI, A. D.; ROSSI, F. S.; SILVA, J. R. **Análise Setorial. Produção de Sucos Tropicais: Maracujá**. Vera Cruz: AFRUVEC, 2001, 47p. (Relatório Técnico).
- RUGGIERO, C. Maracujá: do plantio à colheita. In: **5º Simpósio sobre a cultura do maracujazeiro. Anais...FUNEP/UNESP**. Jaboticabal, 1998, p.388.
- RUVIARO, L.; NOVELLO, D.; ALMEIDA, M. J. Analise sensorial de sobremesa acrescida a farelo de casca e bagaço de laranja entre univertarios de Guarapuava (PR), **Revista Solus**,Guarapuava (PR) v.2, n.2, 2008.
- SÃO JOSÉ, A. R. **Cultivo da graviola**. In: Semana Internacional de Fruticultura. Curso:Fortaleza. Sindifruta, InstitutoFrutal, 35p. 1 CD-ROM, 2000.
- SAHA, C. B. L.; ITEN, L. B; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 3693–3700, 2005.
- SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARAES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana de açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004 – 1110, 2012.
- SCHULZ, M.A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: Polpa e Cascas de Banana**. 2010. 100p. Tese (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.
- SHARMA, N.; KALRA, K. L.; OBEROI, H. S.; BANSAL, S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v.7, p.310-316, 2007.
- SILVA, L. **Estudo da Hidrólise Enzimática do Resíduo de algodão da Indústria Têxtil** (2009). Monografia (Bacharel em Química) Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 77 f., 2009.
- SILVA, N. L. C. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a partir de Biomassa Residual da Indústria de Celulose**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 337-341, 2003.

SILVA, C. E. F.; LOURENCO, J. E. S.; ABUD, A. K. S. Aspectos físico-químicos e energéticos da biodigestão anaeróbica da vinhaça. **In: RenovEnergia. Anais ...** Maceio-AL, 2014.

SIMS, R.; TAYLOR, M.; SADDLER, J.; MABER, W. **From 1st to 2nd generation biofuel technologies.** IEA Bioenergy, dez., 2008.

SOUSA, F. T.; CASTRO, C. F. S.; SOUZA NETO, G. P.; Avaliação do pré-tratamento alcalino de *Panicum maximum* jacq. Cv colônia para otimização da produção de etanol de segunda geração. **I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano.** 06 e 07 de novembro de 2012.

SOUZA, M. W. S.; FERREIRA, T. B. O.; VIEIRA, I. F. R. Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 33;36, jan.– mar., 2008.

SOUZA O.; SCHULZ A. M.; FISCHER G. A. A.; WAGNER T. M.; SELLIN, N. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.8, p.915–921, 2012.

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5/6, p. 367-375, 1996.

SZENGYEL, Z. **Ethanol form wood cellulose enzyme production.** Sweden: Dept. of Chemical Engineering, Lundy University, 2000.

TEIXEIRA, J. C. Utilização da polpa cítrica na alimentação de bovinos leiteiros. Parte I. **Milkbizz Tecnology**, v. 1, n. 3, p. 25-28, 2001.

TSAO, G. T. Conversion of celulosic. Part.1. Structures of celulosic materials and their hydrolysis by enzymes. In: RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; VITOLO, M. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, 2001.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações e perspectivas. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VACCARINO, C.; CURTO, L. R.; TRIPODO, M. M.; PATANÉ, R.; LAGANÁ, G.; RAGNO A. SCP from orange peel by fementation with fungi acid-tread peel. **Biological Wastes**, 30, 1-10, 1989.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutrál detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Jounal of Dairy Science.** V.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VORAGEN, G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J. F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. **Pectins. Food polysaccharides and their applications**. cap. 10. Tephén A. M. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1995.

WIDMEN, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5242–5249, 2010.

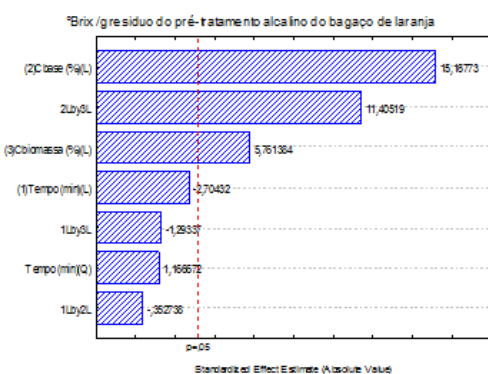
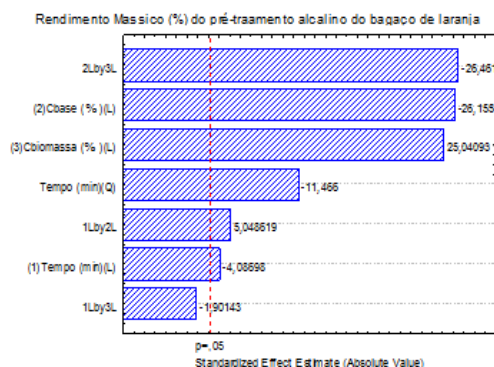
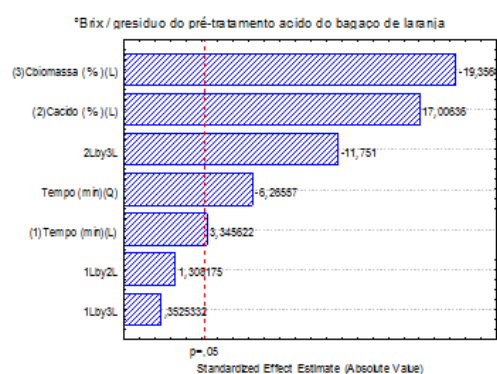
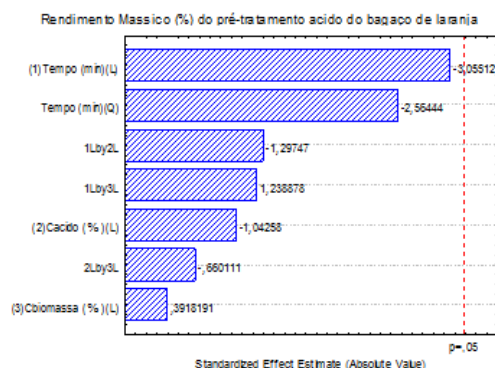
WORLDWATCH INSTITUTE. **Biofuels for Transport**. Ed. Earthscan; ISBN 978-1-84407-422-8, 2007.

YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. São Paulo: CETESB, 2005.

YLITERVO, P. Production of ethanol and biomass from orange peel waste by *Mucor indicus*. University College of Borås. **Master of Science in Chemical Engineering with a Major in Applied Biotechnology**, n. 4, 2008.

ANEXO I

Análise estatística para rendimento mássico e SST para o bagaço de laranja.

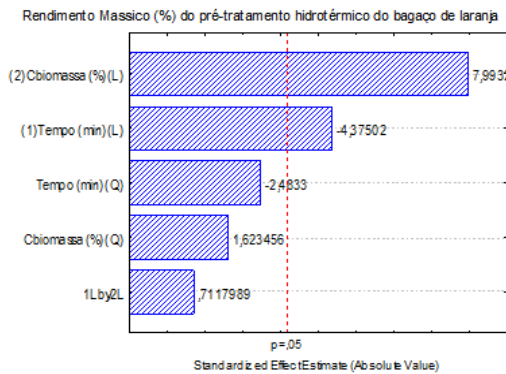


	R ²	0,87397	MS residual	6,6555
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	37,24283	0,785017	47,44206	0,000021
(1)Tempo (min)(L)	-5,57320	1,824215	-3,05512	0,055205
Tempo (min)(Q)	-4,47893	1,746553	-2,56444	0,082893
(2)Cacido (%) (L)	-1,90189	1,824215	-1,04258	0,373767
(3)Cbiomassa (%) (L)	0,71476	1,824215	0,39182	0,721367
1L by 2L	-2,36686	1,824215	-1,29747	0,285230
1L by 3L	2,25998	1,824215	1,23888	0,303486
2L by 3L	-1,20418	1,824215	-0,66011	0,556339

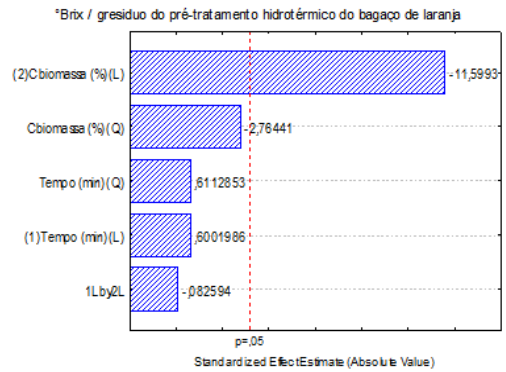
	R ²	0,9965	MS residual	0,0581
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	2,40168	0,073364	32,7366	0,000063
(1)Tempo (min)(L)	0,57037	0,170482	3,3456	0,044202
Tempo (min)(Q)	-1,02269	0,163224	-6,2656	0,008206
(2)Cacido (%) (L)	2,89927	0,170482	17,0064	0,000443
(3)Cbiomassa (%) (L)	-3,29990	0,170482	-19,3564	0,000301
1L by 2L	0,22302	0,170482	1,3082	0,282020
1L by 3L	0,06010	0,170482	0,3525	0,747751
2L by 3L	-2,00333	0,170482	-11,7510	0,001324

	R ²	0,99863	MS residual	1,4092
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	36,7239	0,393797	93,2559	0,000003
(1)Tempo (min)(L)	-3,7400	0,915102	-4,0870	0,026471
Tempo (min)(Q)	-10,0458	0,876143	-11,4660	0,001424
(2)Cacido (%) (L)	-23,9350	0,915102	-26,1556	0,000123
(3)Cbiomassa (%) (L)	22,9150	0,915102	25,0409	0,000140
1L by 2L	4,6200	0,915102	5,0486	0,014989
1L by 3L	-1,7400	0,915102	-1,9014	0,153415
2L by 3L	-24,2150	0,915102	-26,4615	0,000118

	R ²	0,99263	MS residual	0,0045
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	2,841667	0,091498	31,05709	0,000073
(1)Tempo (min)(L)	-0,575000	0,212623	-2,70432	0,073517
Tempo (min)(Q)	0,237500	0,203571	1,16667	0,327650
(2)Cacido (%) (L)	3,225000	0,212623	15,16773	0,000622
(3)Cbiomassa (%) (L)	1,225000	0,212623	5,76138	0,010392
1L by 2L	-0,075000	0,212623	-0,35274	0,747613
1L by 3L	-0,275000	0,212623	-1,29337	0,286468
2L by 3L	2,425000	0,212623	11,40519	0,001446



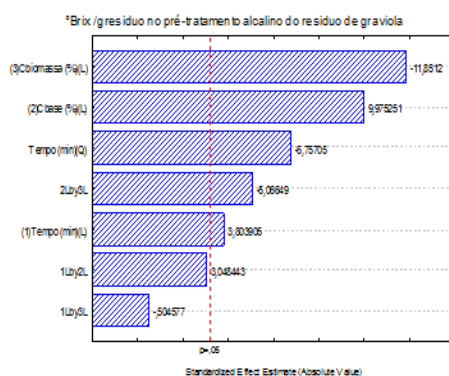
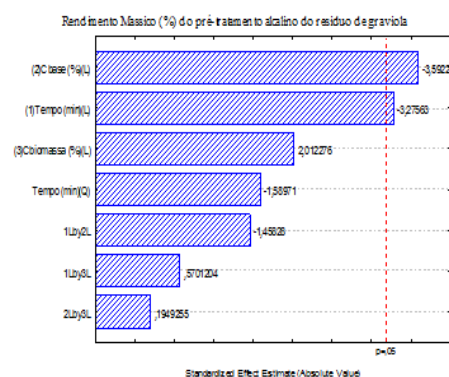
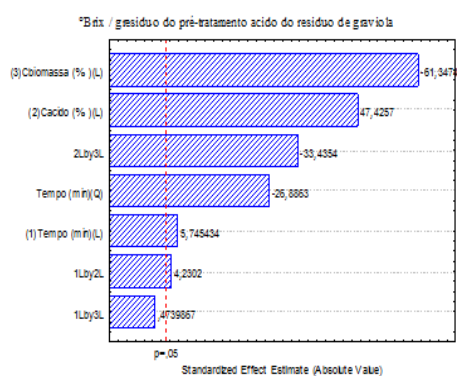
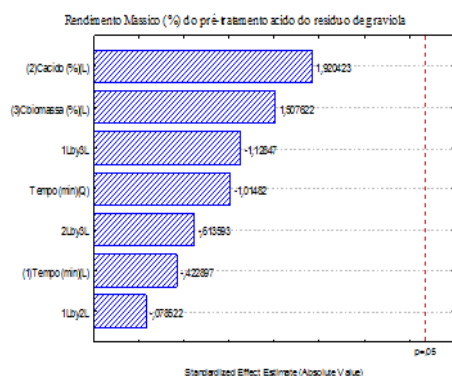
	R ²	0,96853	MS residual	1,4092
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	52,83815	0,395711	133,5271	0,000001
(1)Tempo (min)(L)	-4,24067	0,969290	-4,3750	0,022097
Tempo (min)(Q)	-2,08456	0,839430	-2,4833	0,089010
(2)Cbiomassa (%)(L)	7,74778	0,969290	7,9932	0,004087
Cbiomassa (%)(Q)	1,36278	0,839430	1,6235	0,202952
1L by 2L	0,84500	1,187133	0,7118	0,527949



	R ²	0,97944	MS residual	0,0045
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	0,570988	0,022421	25,466605	0,000133
(1)Tempo (min)(L)	0,032963	0,054920	0,600199	0,590685
Tempo (min)(Q)	0,029074	0,047562	0,611285	0,584214
(2)Cbiomassa (%)(L)	-0,637037	0,054920	-11,599343	0,001376
Cbiomassa (%)(Q)	-0,131481	0,047562	-2,764411	0,069894
1L by 2L	-0,005556	0,067263	-0,082594	0,939376

ANEXO II

Análise estatística para rendimento mássico e SST para o resíduo de graviola.

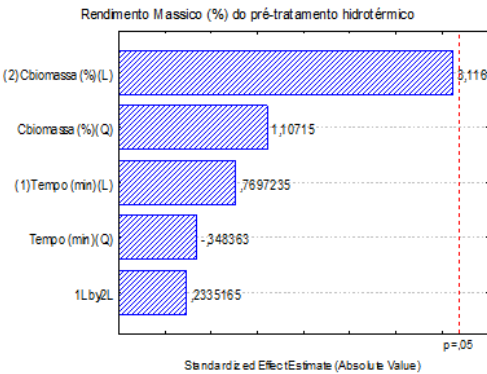


	R ²	0,7963	MS residual	9,9339
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	66,86694	0,959069	69,72065	0,000007
(1)Tempo (min)(L)	-0,94250	2,228676	-0,42290	0,700854
Tempo (min)(Q)	-2,16542	2,133795	-1,01482	0,384920
(2)Cacido (%) (L)	4,28000	2,228676	1,92042	0,150575
(3)Cbiomassa (%) (L)	3,36000	2,228676	1,50762	0,228762
1L by 2L	-0,17500	2,228676	-0,07852	0,942357
1L by 3L	-2,51500	2,228676	-1,12847	0,341212
2L by 3L	-1,36750	2,228676	-0,61359	0,582874

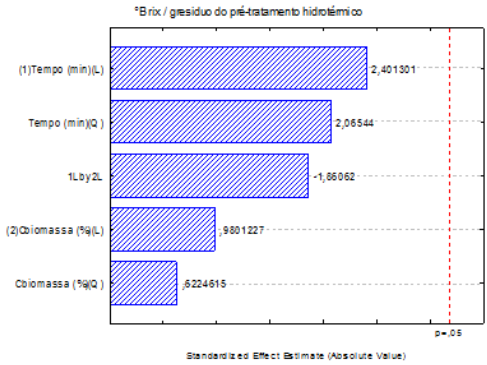
	R ²	0,9996	MS residual	0,0132
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	2,89375	0,034951	82,7949	0,000004
(1)Tempo (min)(L)	0,46664	0,081218	5,7454	0,010473
Tempo (min)(Q)	-2,09070	0,077761	-26,8863	0,000113
(2)Cacido (%) (L)	3,85184	0,081218	47,4257	0,000021
(3)Cbiomassa (%) (L)	-4,98254	0,081218	-61,3474	0,000010
1L by 2L	0,34357	0,081218	4,2302	0,024169
1L by 3L	0,03850	0,081218	0,4740	0,667871
2L by 3L	-2,71557	0,081218	-33,4354	0,000059

	R ²	0,9159	MS residual	5,8194
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	44,93083	0,734051	61,20943	0,000010
(1)Tempo (min)(L)	-5,58750	1,705780	-3,27563	0,046579
Tempo (min)(Q)	-2,59625	1,633160	-1,58971	0,210120
(2)Cacido (%) (L)	-6,12750	1,705780	-3,59220	0,036966
(3)Cbiomassa (%) (L)	3,43250	1,705780	2,01228	0,137680
1L by 2L	-2,48750	1,705780	-1,45828	0,240841
1L by 3L	0,97250	1,705780	0,57012	0,608497
2L by 3L	0,33250	1,705780	0,19493	0,857906

	R ²	0,9911	MS residual	0,0389
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	1,08673	0,060078	18,0888	0,000369
(1)Tempo (min)(L)	0,53105	0,139608	3,8039	0,031920
Tempo (min)(Q)	-0,90318	0,133664	-6,7570	0,006622
(2)Cacido (%) (L)	1,39262	0,139608	9,9753	0,002144
(3)Cbiomassa (%) (L)	-1,65452	0,139608	-11,8512	0,001292
1L by 2L	0,42559	0,139608	3,0484	0,055496
1L by 3L	-0,07044	0,139608	-0,5046	0,648585
2L by 3L	-0,70732	0,139608	-5,0665	0,014844



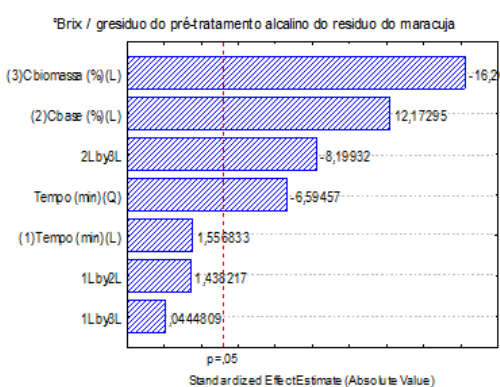
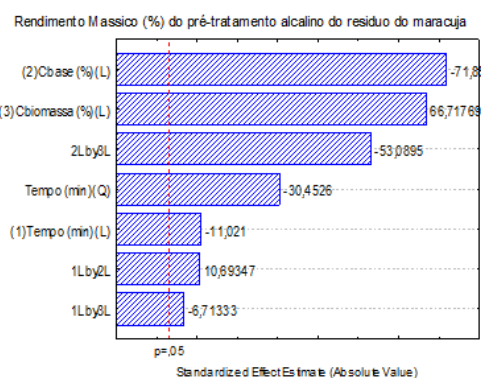
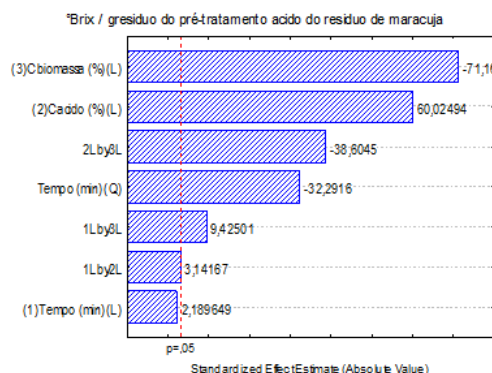
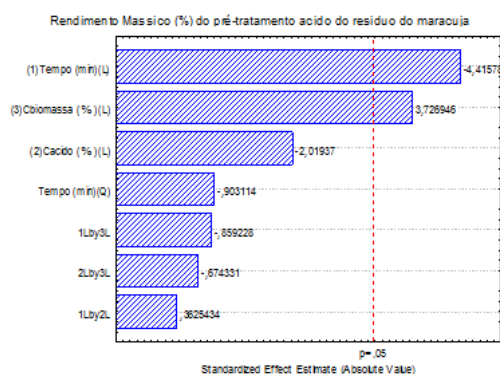
	R ²	0,796	MS residual	6,7679
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	72,51722	0,867176	83,62455	0,000004
(1)Tempo (min)(L)	1,63500	2,124139	0,76972	0,497518
Tempo (min)(Q)	-0,64083	1,839559	-0,34836	0,750581
(2)Cbiomassa (%)(L)	6,62000	2,124139	3,11656	0,052612
Cbiomassa (%)(Q)	2,03667	1,839559	1,10715	0,349024
1L by 2L	0,60750	2,601529	0,23352	0,830387



	R ²	0,796	MS residual	6,7679
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	72,51722	0,867176	83,62455	0,000004
(1)Tempo (min)(L)	1,63500	2,124139	0,76972	0,497518
Tempo (min)(Q)	-0,64083	1,839559	-0,34836	0,750581
(2)Cbiomassa (%)(L)	6,62000	2,124139	3,11656	0,052612
Cbiomassa (%)(Q)	2,03667	1,839559	1,10715	0,349024
1L by 2L	0,60750	2,601529	0,23352	0,830387

ANEXO III

Análise estatística para rendimento mássico e SST para o resíduo de maracujá.

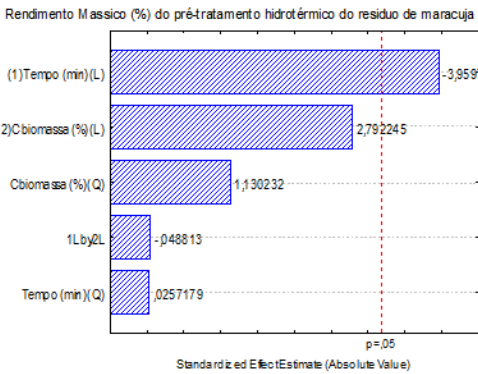


	R ²	0,9295	MS residual	3,804
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	35,06500	0,593490	59,08275	0,000011
(1)Tempo (min)(L)	-6,09000	1,379145	-4,41578	0,021556
Tempo (min)(Q)	-1,19250	1,320431	-0,90311	0,433034
(2)Cacido (%)(L)	-2,78500	1,379145	-2,01937	0,136740
(3)Cbiomassa (%)(L)	5,14000	1,379145	3,72695	0,033646
1L by 2L	0,50000	1,379145	0,36254	0,740982
1L by 3L	-1,18500	1,379145	-0,85923	0,453393
2L by 3L	-0,93000	1,379145	-0,67433	0,548413

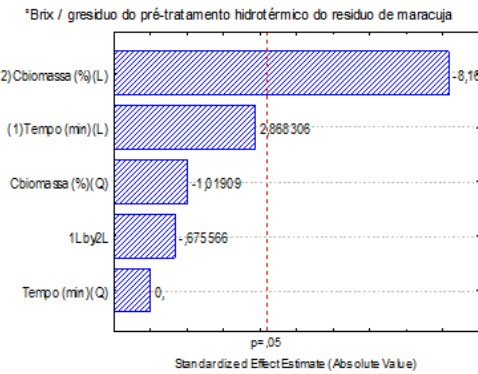
	R ²	0,9997	MS residual	0,0055
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	2,36250	0,022601	104,5311	0,000002
(1)Tempo (min)(L)	0,11500	0,052520	2,1896	0,116293
Tempo (min)(Q)	-1,62375	0,050284	-32,2916	0,000065
(2)Cacido (%)(L)	3,15250	0,052520	60,0249	0,000010
(3)Cbiomassa (%)(L)	-3,73750	0,052520	-71,1636	0,000006
1L by 2L	0,16500	0,052520	3,1417	0,051597
1L by 3L	0,49500	0,052520	9,4250	0,002531
2L by 3L	-2,02750	0,052520	-38,6045	0,000038

	R ²	0,9998	MS residual	0,0787
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	39,3047	0,085415	460,1640	0,000000
(1)Tempo (min)(L)	-2,1875	0,198486	-11,0210	0,001600
Tempo (min)(Q)	-5,7871	0,190035	-30,4526	0,000078
(2)Cacido (%)(L)	-14,2625	0,198486	-71,8566	0,000006
(3)Cbiomassa (%)(L)	13,2425	0,198486	66,7177	0,000007
1L by 2L	2,1225	0,198486	10,6935	0,001748
1L by 3L	-1,3325	0,198486	-6,7133	0,006745
2L by 3L	-10,5375	0,198486	-53,0895	0,000015

	R ²	0,9943	MS residual	0,0568
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	1,58639	0,072559	21,8635	0,000209
(1)Tempo (min)(L)	0,26250	0,168612	1,5568	0,217376
Tempo (min)(Q)	-1,06458	0,161433	-6,5946	0,007097
(2)Cacido (%)(L)	2,05250	0,168612	12,1729	0,001194
(3)Cbiomassa (%)(L)	-2,73250	0,168612	-16,2059	0,000511
1L by 2L	0,24250	0,168612	1,4382	0,245949
1L by 3L	0,00750	0,168612	0,0445	0,967316
2L by 3L	-1,38250	0,168612	-8,1993	0,003796



	R ²	0,8919	MS residual	3,0322
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	55,34222	0,580445	95,34442	0,000003
(1)Tempo (min)(L)	-5,63000	1,421795	-3,95978	0,028758
Tempo (min)(Q)	0,03167	1,231310	0,02572	0,981097
(2)Cbiomassa (%)(L)	3,97000	1,421795	2,79225	0,068291
Cbiomassa (%)(Q)	1,39167	1,231310	1,13023	0,340575
1L by 2L	-0,08500	1,741336	-0,04881	0,964136



	R ²	0,9622	MS residual	0,0031
	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p
Media/Inter	0,526667	0,018503	28,46385	0,000095
(1)Tempo (min)(L)	0,130000	0,045323	2,86831	0,064139
Tempo (min)(Q)	0,000000	0,039251	0,00000	1,000000
(2)Cbiomassa (%)(L)	-0,370000	0,045323	-8,16364	0,003845
Cbiomassa (%)(Q)	-0,040000	0,039251	-1,01909	0,383185
1L by 2L	-0,037500	0,055509	-0,67557	0,547729