



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO DE BÁSICO
NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE ACEROLA

REBECA DE ALMEIDA SILVA

CAMPINA GRANDE – PB

2014

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO DE BÁSICO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE ACEROLA

REBECA DE ALMEIDA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Lúbia de Sousa Conrado de Oliveira.

CAMPINA GRANDE – PB

2014

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO DE BÁSICO
NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE ACEROLA**

REBECA DE ALMEIDA SILVA

Dissertação aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Orientadora - UAEQ/CCT/UFCG

Prof. Dr. Laércio Gomes de Oliveira

Examinador Interno - UAEQ/CCT/UFCG

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Santiago

Examinador Externo – DEQ/CCT/UEPB

CAMPINA GRANDE - PB

2014

A Deus e a minha família, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por sempre está ao meu lado, me protegendo e iluminando os meus passos e por permitir grandes vitórias em minha vida.

Aos meus pais Anselmo e Eliane, pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo, educação, exemplos como pessoas e por serem à base da minha vida.

Aos meus irmãos Camila, Jacqueline, Daniel e Nayara e toda a minha família, pelo amor, apoio e torcida pelo meu sucesso pessoal e profissional.

À minha orientadora, Professor Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela amizade, confiança, atenção e total disponibilidade para me orientar frente a esta dissertação.

Aos professores Dr. Laércio Gomes de Oliveira e Dr^a. Ângela Maria Santiago pela confiança, atenção e contribuição frente a esta dissertação.

À todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica - LEB da UFCG, por toda a ajuda, apoio, amizade e companheirismo de cada um.

Aos amigos que não poderia deixar de citar, Raphael Eduardo, Cristiane Rodrigues, Alana Crispim, Everton Ranny, Beatriz de Melo e Douglas Saraiva. A cada um de uma maneira muito especial, quero agradecer pela ajuda, apoio, incentivo e principalmente pela sincera amizade.

À Universidade Federal de Campina Grande pelos conhecimentos adquiridos durante toda a minha formação como Engenheira Química e aos professores e funcionários da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da UFCG, por todo o aprendizado, pela assistência e disponibilidade a ajudar.

À todos que me conhecem e fazem parte da minha vida, que acreditam no meu potencial e torcem por cada vitória por mim vivenciada.

Até aqui nos ajudou o Senhor.

I Samuel 7:12

RESUMO

Com a atual busca mundial por fontes renováveis, o uso de resíduos de biomassa lignocelulósica apresenta uma perspectiva bastante promissora para a produção de etanol. O processo deriva da fermentação de açúcares de origem hemicelulósica e celulósica, frações de materiais lignocelulósicos, através de um pré-tratamento adequado e da hidrólise enzimática da celulose. O resíduo da acerola constitui de 40 % do volume processado, sendo 24,7 % de celulose, 19,27 % de hemicelulose e 28,37 % de lignina. O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética da hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* e do bagaço pré-tratado e avaliar o efeito desse pré-tratamento sobre a hidrólise. Inicialmente foi feita a caracterização lignocelulósica do bagaço *in natura* e do bagaço pré-tratado e a caracterização microestrutural por meio das análises de DRX e MEV. Ao bagaço de acerola foi aplicado o pré-tratamento ácido seguido de básico. Em seguida foi realizada a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* e pré-tratado. Foram usadas as enzimas comerciais Celluclast 1.5L da Novozyme e beta-glicosidase da Proenzyme. Como ferramenta para avaliação das variáveis que influenciam no processo usou-se um planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais, onde as variáveis analisadas foram carga enzimática e relação de massa seca de bagaço por volume do meio reacional. A caracterização lignocelulósica mostrou que o bagaço de acerola é um substrato viável para obtenção de açúcares fermentescíveis e sua subsequente conversão em etanol. O pré-tratamento ácido seguido de básico mostrou-se bastante eficiente em concentrar a celulose, pela remoção de parte da hemicelulose e lignina, provocando um aumento da celulose de 25 % para 50 %. Evidenciou-se a cristalinidade do bagaço de acerola, comprovada por Difração de Raios X e a modificação na morfologia do bagaço, verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura. Por meio da cinética de hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado foram obtidos rendimentos de 100 % na conversão da celulose em glicose. A melhor produção de glicose foi de 22,3 g/L alcançada em 36 horas de hidrólise para o bagaço de acerola pré-tratado, onde ocorreu nas maiores condições de carga enzimática e relação massa seca de bagaço por volume reacional.

Palavras-Chave: Bagaço de Acerola, Pré-Tratamento, Hidrólise Enzimática.

ABSTRACT

With the current worldwide search for renewable sources, the use of lignocellulosic biomass waste has a very promising perspective for ethanol production. The process derives from the fermentation of sugar from hemicellulose and cellulose origin, fractions of lignocellulosic materials, by a suitable pre-treatment and enzymatic hydrolysis of cellulose. The waste of acerola is constituted by 40 % of the processed volume, and 24,7 % of cellulose, 19,27 % of hemicellulose and 28,37 % of lignin. The aim of this work was to study the kinetics of enzymatic hydrolysis of acerola's waste *in natura* and waste pretreated, and also to evaluate the effect of this pretreatment on the hydrolysis. Initially, a lignocellulosic characterization was made with the waste *in natura* and waste pretreated, and microstructural characterization by means of XRD and SEM analysis. To the waste of acerola, an acid pretreatment was applied, followed by alkaline pretreatment. Then, the enzymatic hydrolysis of waste *in natura* and pretreated was performed. Commercial enzymes Celluclast 1.5L (Novozyme) and beta-glucosidase (Proenzyme) were used. As a tool to evaluate the variables that influence the process, a factorial design 2^2 was used with three central points, and the analyzed variables were enzymatic load and ratio of dry weight of waste per volume of reaction. This lignocellulosic characterization showed that the waste of acerola is a viable substrate for obtaining fermentable sugars and its subsequent conversion to ethanol. The acid pretreatment followed by the alkaline showed to be very effective in concentrating the cellulose, by the removal of part of the hemicellulose and lignin, causing an increase of the cellulose from 25 % to 50 %. The crystallinity of waste of acerola was evidenced by X-ray Diffraction and the modification in the morphology of waste, verified by Scanning Electron Microscopy. Through the kinetics of enzymatic hydrolysis of waste of acerola *in natura* and pretreated, yields of 100 % were obtained, in the conversion of cellulose to glucose. The best glucose production was 22,3 g/L, reached in 36 hours of hydrolysis of waste of acerola pretreated, which occurred in the best conditions of enzyme load and dry weight of waste per reaction volume ratio.

Keywords: Waste of Acerola, Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema Estrutural das Fibras de um Material Lignocelulósico.....	18
Figura 2 - Representação da cadeia linear da celulose, formada de varias unidades consecutivas de celobiose.....	19
Figura 3 – Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila.....	20
Figura 4 – Representação das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose.....	21
Figura 5 – Monossacarídeos constituintes da Hemicelulose.....	22
Figura 6 – Estrutura típica da Hemicelulose.....	23
Figura 7 – Precursores Primários da Lignina.....	25
Figura 8 – Representação esquemática da Lignina.....	26
Figura 9 – Fruto Acerola.....	27
Figura 10 – Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....	30
Figura 11 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.....	35
Figura 12 – Fluxograma para obtenção de açúcares fermentescíveis.....	37
Figura 13 - Resíduo de Acerola obtido no Decanter.....	38
Figura 14 - Resíduo de Acerola Seco e Moído.....	38
Figura 15 - Resíduo de Acerola embalado á Vácuo.....	39
Figura 16 – Conjunto Cadinho/Material depois de Calcinado.....	40
Figura 17 - Sistema de Extração.....	41
Figura 18 – Sistema utilizado para realização da Reação.....	44
Figura 19 – Formação de Gás Cloro no decorrer da Reação.....	44
Figura 20 – Constituição do Bagaço de Acerola <i>in natura</i>	53
Figura 21 – Constituição do Bagaço de Acerola pré-tratado.....	53
Figura 22 – Difratomogramas: (a) Bagaço de acerola <i>in natura</i> ; (b) Bagaço de acerola pré-tratado.....	55
Figura 23 - Micrografias do Bagaço de acerola <i>in natura</i>	56

Figura 24 - Micrografias do Bagaço de acerola pré-tratado.....	57
Figura 25 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola <i>in natura</i> para as condições 1, 2, 3 e 4.....	60
Figura 26 – Cinética da Hidrólise Enzimática d Bagaço de acerola <i>in natura</i> para as condições 5, 6 e 7 (Pontos Centrais).....	61
Figura 27 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola pré-tratado para as condições 1, 2, 3 e 4.....	62
Figura 28 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola pré-tratado para as condições 5, 6 e 7 (Pontos Centrais).....	63
Figura 29 - Diagrama de Pareto para a Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola <i>in natura</i> em 36 horas.....	65
Figura 30 - Superfície de resposta para produção de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola <i>in natura</i> no tempo de 36 horas.....	66
Figura 31 - Diagrama de Pareto para a Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola pré-tratado em 36 horas.....	67
Figura 32 - Superfície de resposta para produção de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado no tempo de 36 horas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Química de alguns Materiais Lignocelulósicos.....	18
Tabela 2 – Diferenças entre a Celulose e a Hemicelulose.....	24
Tabela 3 – Caracterização Físico-química dos resíduos agroindustriais da mangaba, acerola e graviola.....	28
Tabela 4 – Composição Físico-química e percentagem de matéria seca de subprodutos da Acerola.....	29
Tabela 5 – Classificação dos Pré-Tratamentos.....	31
Tabela 6 - Matriz de Planejamento Fatorial 2 ²	49
Tabela 7 - Níveis Codificados e Reais das Variáveis Independentes para o Planejamento Fatorial.....	49
Tabela 8 – Caracterização Lignocelulósica do Bagaço de Acerola.....	52
Tabela 9 - Massa das amostras após cada Pré-tratamento.....	58
Tabela 10 – Rendimento de cada Pré-tratamento.....	58
Tabela 11 – Concentração teórica de Glicose para o Bagaço de acerola <i>in natura</i>	64
Tabela 12 – Concentração teórica de Glicose para o Bagaço de acerola pré-tratado.....	64
Tabela 13 - Análise de Variância (ANOVA) para Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola <i>in natura</i> em 36 horas.....	65
Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) para Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola pré-tratado em 36 horas.....	67

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

LEB - Laboratório de Engenharia Bioquímica

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

% - Porcentagem

DRX - Difração de raios X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

FPU/g – Unidades de Papel de Filtro por grama

t – Tonelada

°C - Graus Celcius

h - Horas

g – Grama

°C/min – Grau Celsius por minuto

mL – Mililitro

m/m – Massa por massa

m/v – Massa por volume

kV – Quilovolts

mA – Miliampêre

LABNOV – Laboratório de Desenvolvimento de Novos Materiais

mg – Miligrama

mmol/L – Milimol por litro

nm - Nanômetro

μL - Microlitro

μm - Micrometro

g/L – Grama por litro

mg/L – Miligrama por litro

FPU/ml – Unidades de Papel de Filtro por mililitro

mL/min – Mililitro por minuto

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVO GERAL.....	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	17
2.1.1. Celulose.....	19
2.1.2. Hemicelulose.....	21
2.1.3. Lignina.....	24
2.2. ACEROLA.....	26
2.3. PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	29
2.3.1. Pré-Tratamento Ácido.....	31
2.3.2. Pré-Tratamento Básico.....	32
2.4. HIDROLISE ENZIMÁICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	33
3 - MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. MATÉRIA PRIMA.....	37
3.1.1. Enzimas.....	39
3.2. CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DO MATERIAL.....	39
3.2.1. Determinação do Teor de Umidade.....	39
3.2.2. Determinação do Teor de Cinzas.....	40
3.2.3. Determinação do Teor de Extrativos.....	41
3.2.4. Determinação de Lignina.....	42
3.2.5. Determinação de Holocelulose.....	43
3.2.6. Determinação de α -celulose.....	46
3.3. CARACTERIZAÇÃO MICROESTUTURAL.....	47
3.3.1. Difração de raios X (DRX).....	47
3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
3.4. PRÉ-TRATAMENTO.....	48

3.4.1. Pré-Tratamento Ácido.....	48
3.4.2. Pré-Tratamento Básico.....	48
3.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	49
3.5.1. Preparação do Extrato Enzimático Utilizado na Hidrólise.....	50
3.5.2. Determinação da Atividade Enzimática.....	50
3.5.3. Determinação de Açúcares Redutores.....	51
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DO SUBSTRATO.....	52
4.2. CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL.....	55
4.2.1. Difração de Raios X (DRX).....	55
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
4.3. PRÉ-TRATAMENTO.....	57
4.4. CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	59
4.4.1. Análise Estatística dos Dados Experimentais.....	65
5 – CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE.....	80

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural, além de serem fontes esgotáveis de energia, geram poluentes em sua combustão, tais como o monóxido de carbono e o dióxido de carbono, que é um dos responsáveis pelo aquecimento global (WANG e WAN, 2009).

Uma das preocupações do mundo atual é com o suprimento de energia nas próximas décadas, uma vez que a principal fonte de energia hoje é o petróleo, e por se tratar de um combustível fóssil, não é renovável. Essa fonte ainda representa 40 % da energia utilizada no mundo, e também, o recente retorno ao aumento no seu preço, as perspectivas de esgotamento de reservas e os compromissos mais sólidos com as questões ambientais (BASTOS, 2007).

A necessidade de um aumento significativo na produção de etanol, sem aumentar a exploração das terras cultiváveis, nos leva à constatação de um novo padrão de produção de energia a partir da biomassa, em especial de resíduos lignocelulósicos (BENEDETTI *et al.*, 2009).

As biomassas residuais, de natureza lignocelulósica, assumem papel indispensável para solução do problema de disponibilidade de terras agricultáveis e suprimento da demanda energética. Resíduos agrícolas e agroindustriais, que antes eram utilizados como adubo, combustíveis de caldeiras ou ficavam ao relento gerando impactos ambientais, hoje representam uma fonte de oportunidades inestimáveis para produção de biocombustíveis e outros compostos de extensa faixa de valores (PEREIRA JR. e SCHLITTLER, 2008).

Os materiais lignocelulósicos representam a maior porcentagem de biomassa de baixo custo existente, abrangendo resíduos de origem doméstica, agricultora e industrial, permitindo a obtenção de um combustível de valor agregado e a reutilização de um rejeito (ALZATE e TORO, 2006; HU e WEN, 2008).

As tecnologias para a obtenção de bioetanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

A hidrólise converte a celulose em glicose, após a quebra das ligações glicosídicas. Este processo pode ser catalisado com diferentes tipos de ácidos diluídos ou concentrados ou por meio das enzimas celulolíticas (celulases). Considerando-se que o rendimento do processo é baixo (inferior a 20 %), é possível aumentar sua eficiência adotando-se procedimentos de pré-tratamento (HAMELINCK *et al.*, 2005).

O alvo da tecnologia de pré-tratamento é remover barreiras estruturais e composicionais dos materiais lignocelulósicos, promovendo uma melhora na percentagem de hidrólise e aumento dos rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir da celulose e hemicelulose (MOSIER *et al.*, 2005).

Atualmente, uma diversidade de pré-tratamentos tem sido avaliada na remoção de açúcares de lignocelulósicos, destacando-se pré-tratamento com ácido diluído e concentrado em simples e duplo estágio (H_2SO_4 , H_3PO_4 e SO_2), com álcalis e agentes oxidantes (NaOH, APEX e H_2O_2) (SAHA, 2003).

A acerola ou cereja tropical é uma fruta que vem se destacando mundialmente, devido ao alto teor de vitamina C e outros compostos bioativos. O Brasil é o maior produtor, sendo a região Nordeste responsável por grande parte da produção nacional (FAO, 2010). Os resíduos do processamento da acerola representam 40 % do volume processado (SANTOS *et al.*, 2010).

Uma alternativa para a diminuição no acúmulo desses resíduos é a sua utilização como substrato em processos fermentativos, auxiliando assim a redução dos problemas de poluição ambiental (SOCCOL *et al.*, 2003).

Nesse contexto, o bagaço de acerola se enquadra como fonte lignocelulósica alternativa abundante e de baixo custo para obtenção de açúcares fermentescíveis e sua subsequente conversão em etanol.

Avaliou-se nesse trabalho o efeito do pré-tratamento ácido combinado com o pré-tratamento álcali na geração de açúcares fermentescíveis através da hidrólise enzimática do bagaço de acerola para subsequente fermentação.

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a cinética da hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado na conversão de celulose em glicose e o efeito do pré-tratamento empregado sobre a hidrólise.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, α -celulose e hemicelulose;
- Caracterizar o bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado por meio das análises de Difração de raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Realizar um pré-tratamento ácido seguido de um pré-tratamento básico no bagaço *in natura* e avaliar seu efeito na hidrólise enzimática;
- Determinar a atividade enzimática do complexo enzimático utilizado;
- Realizar a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* e pré-tratado e utilizando a metodologia de planejamento fatorial do tipo 2^2 com três repetições no ponto central para avaliar a influência das variáveis carga enzimática (FPU/g) e porcentagem massa por volume do meio reacional sobre o processo (eficiência de conversão de glicose);
- Determinar as condições ótimas (ponto ótimo) para a degradação da celulose em glicose para uma posterior fermentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

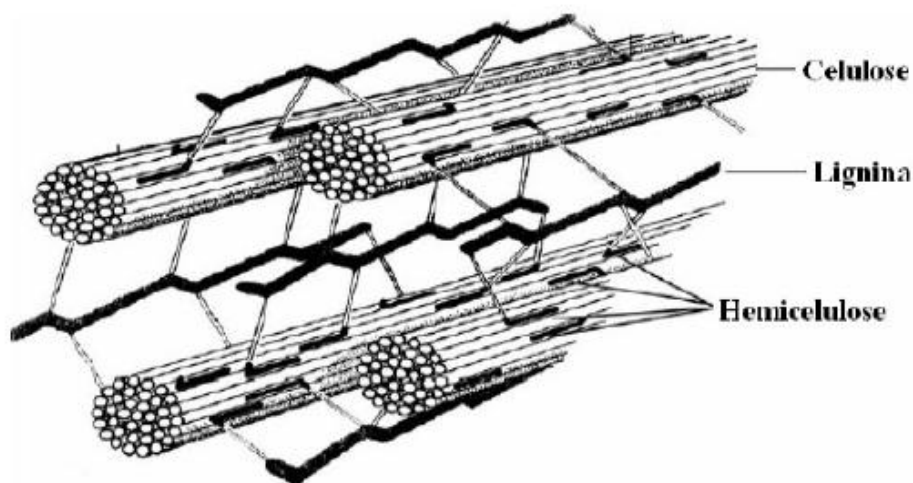
2.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As biomassas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Os materiais lignocelulósicos são abundantes fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como matéria-prima podem minimizar a falta de alimentos, resolver problemas de desperdício e diminuir a dependência do homem por combustíveis fósseis através do fornecimento de uma conveniente e renovável fonte de energia na forma de glicose (OJUMU *et al.*, 2003).

Esses materiais são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70 % da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por alcoóis aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (Figura 1) (LEE, 1997).

Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (CASTRO, 2006).

Figura 1 – Esquema Estrutural das Fibras de um Material Lignocelulósico.

Fonte: (LEE, 1997).

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, da espécie da planta, da região de cultivo, idade e período do ano em que se realiza a colheita do material, dentre outros fatores que a influenciam (HASSUANI, 2005).

A Tabela 1 mostra algumas fontes de materiais lignocelulósicos e sua composição básica aproximada.

Tabela 1 – Composição Química de alguns Materiais Lignocelulósicos.

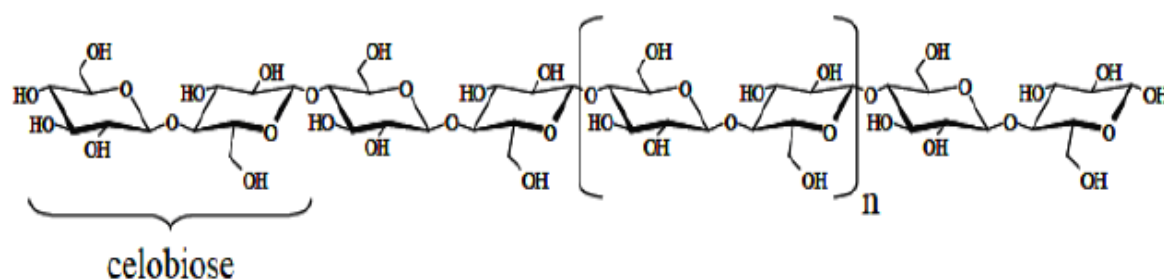
MATERIAL	COMPONENTES (%)			
	CELULOSE	HEMICELULOSE	LIGNINA	CINZAS
Bagaço de Cana	33-36	28-30	18-20	2-5
Palha de Cana	32-36	19-21	16-18	-
Palha de Arroz	32-37	19-24	9-13	12-18
Palha de Trigo	30-33	22-28	14-18	3-7
Palha de Sorgo	34-36	45-48	25-26	-
Sabugo de Milho	34-36	16-24	15-19	-
Papel	43	13	6	-
Madeira	50	20	10	5

Fonte: (OLSSON E HAHN-HAGERDAL, 1996; LEE, 1997).

2.1.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). As ligações glicosídicas são formadas pela eliminação de uma molécula de água, envolvendo os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 de duas glicoses adjacentes. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose, como mostra a Figura 2, e é considerado a unidade estrutural básica da celulose (LORENCINE, 2013).

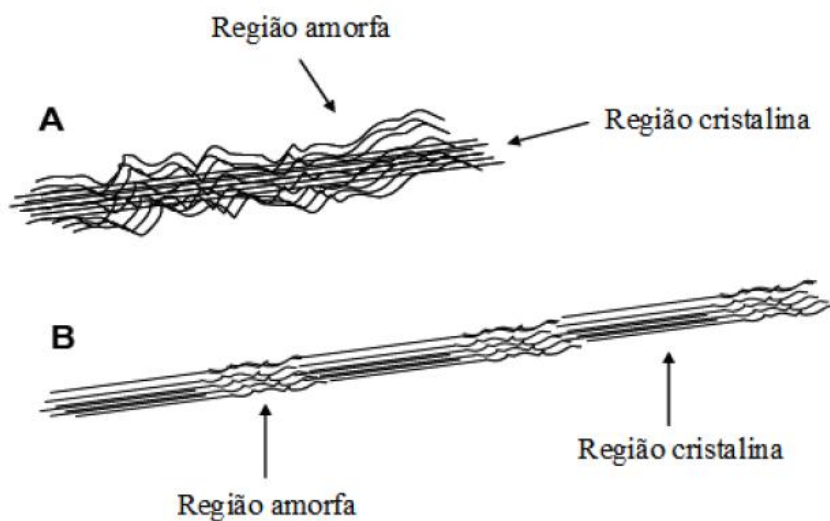
Figura 2 - Representação da cadeia linear da celulose, formada de varias unidades consecutivas de celobiose.



Fonte: (TIMAR-BALÁZSY e EASTOP, 1998).

A estrutura da celulose conforme mostra a Figura 3, apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por inúmeras ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e áreas menos ordenadas chamadas de regiões amorfas (FAN *et al.*, 1987).

Figura 3 – Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila.



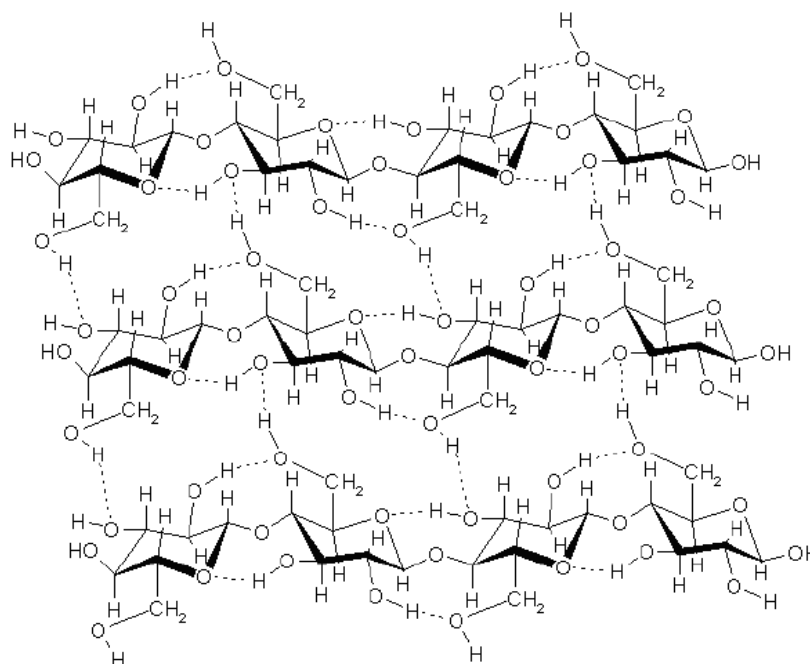
Fonte: (RABELO, 2010).

A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo.

B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal.

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose (Figura 4). As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, as chamadas regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

Figura 4 – Representação das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose.



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

As propriedades grau de polimerização e índice de cristalinidade são importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988).

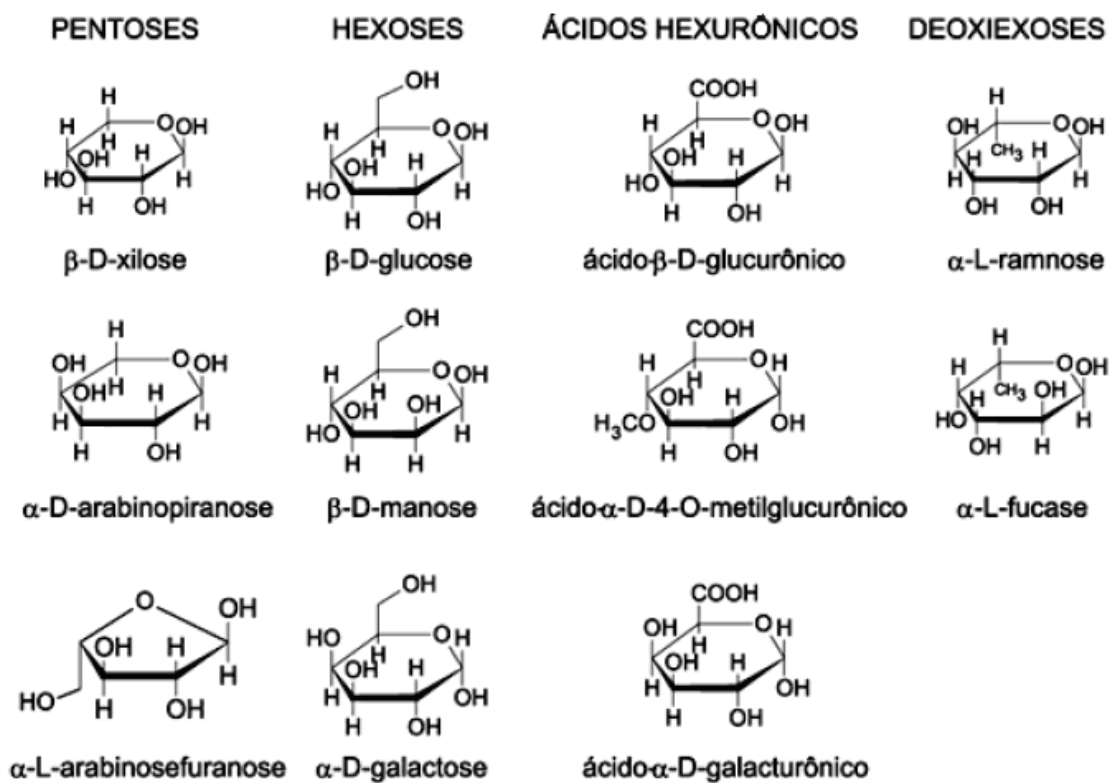
As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina, formando os materiais lignocelulósicos (CARLILE *et al.*, 2002).

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissarídeo formado por pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos-4-*O*-metilglucurônico e galacturônico) (Figura 5). A xilose constitui o maior componente da hemicelulose, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo a

xilana (principal componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose, unidas por ligações β -1,4) (BALAT *et al.*, 2008).

Figura 5 – Monossacarídeos constituintes da Hemicelulose.

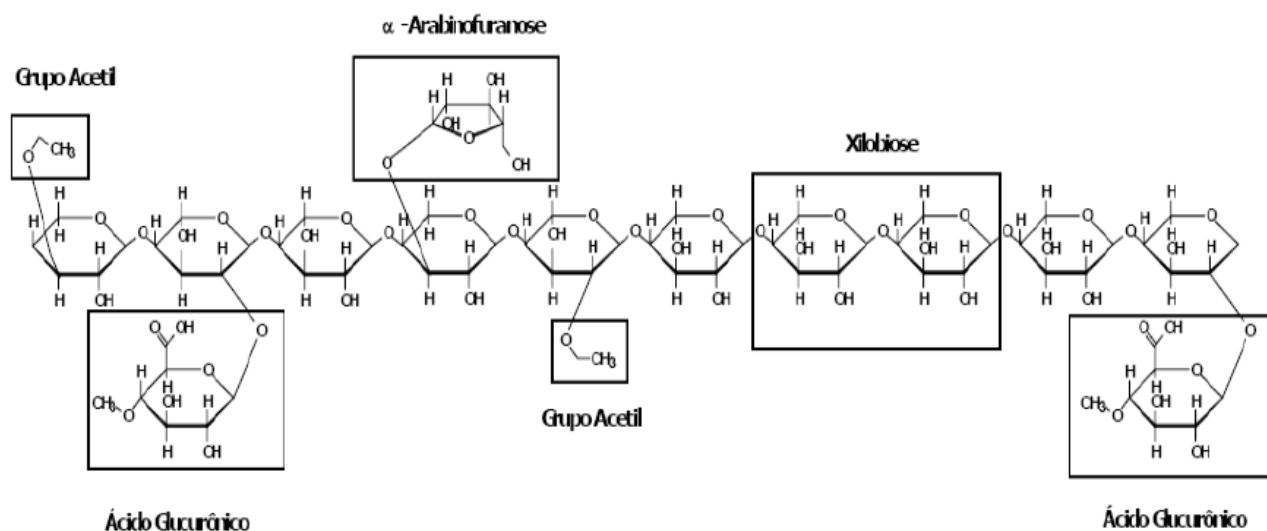


Fonte: (MORAIS *et al.*, 2005).

A xilana é o principal componente da fração hemicelulósica e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (COLLINS *et al.*, 2005). Devido à estrutura complexa da fração hemicelulósica, torna-se necessário uma variedade de enzimas para sua degradação ou modificação. As duas principais enzimas capazes de despolimerizar a cadeia de hemicelulose são a endo-1,4- β -D-xilanase e a endo-1,4- β -D-mananase, ambas glicosil hidrolases (SINGH *et al.*, 2003).

A Figura 6 ilustra a estrutura de uma hemicelulose, na qual a cadeia linear representa a xilana.

Figura 6 – Estrutura típica da Hemicelulose.



Fonte: (MUSSATO, 2002).

As cadeias de hemicelulose podem ser constituídas por apenas unidades monossacarídica, como é o caso das xilanas, ou por duas ou mais unidades, como no caso das 4-O-metil-glucuronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (FENGEL e WEGENER, 1989).

Estruturalmente são mais parecidas com a celulose do que a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando flexibilidade e estabilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Comparada as celuloses, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos.

A Tabela 2 resume as principais diferenças entre a celulose e a hemicelulose.

Tabela 2 – Diferenças entre a Celulose e a Hemicelulose.

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de Glicose ligadas entre si	Unidades variadas de açúcares
Grau de Polimerização elevado	Grau de Polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalinas	Forma somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

Fonte: (BIANCHI, 1995).

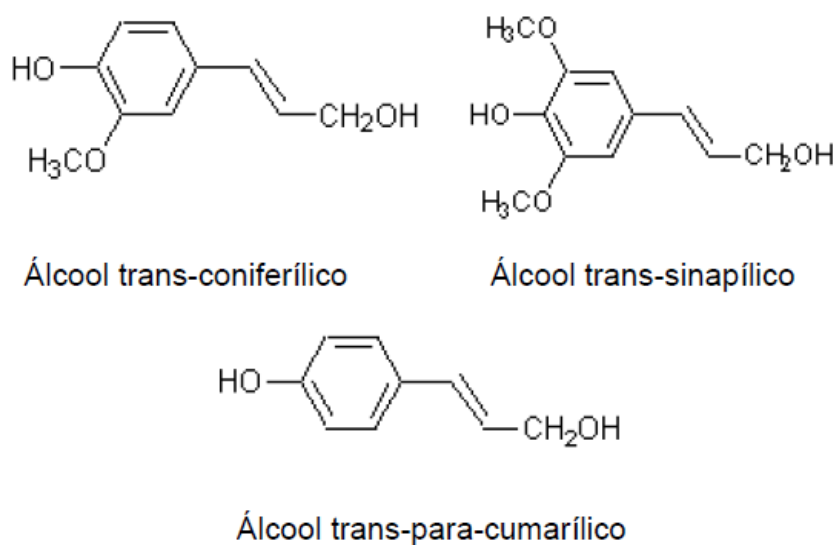
Embora ambas sejam constituídas por açúcares, existem relevantes diferenças de comportamento reacional entre as celuloses e hemiceluloses, devido, principalmente, a estrutura física das duas. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Ainda que não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativamente impossível (BIANCHI, 1995).

2.1.3. Lignina

A lignina é um polímero que possui uma estrutura polifenólica complexa, uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano. Pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três monômeros precursores (Figura 7): os alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (DENCE e LIN, 1992).

No entanto, sabe-se que os polímeros derivados do álcool sinapílico é que são os principais responsáveis pela ligação com a fração hemicelulósica contida nessa biomassa (SUN *et al.*, 2004).

Figura 7 – Precursores Primários da Lignina.

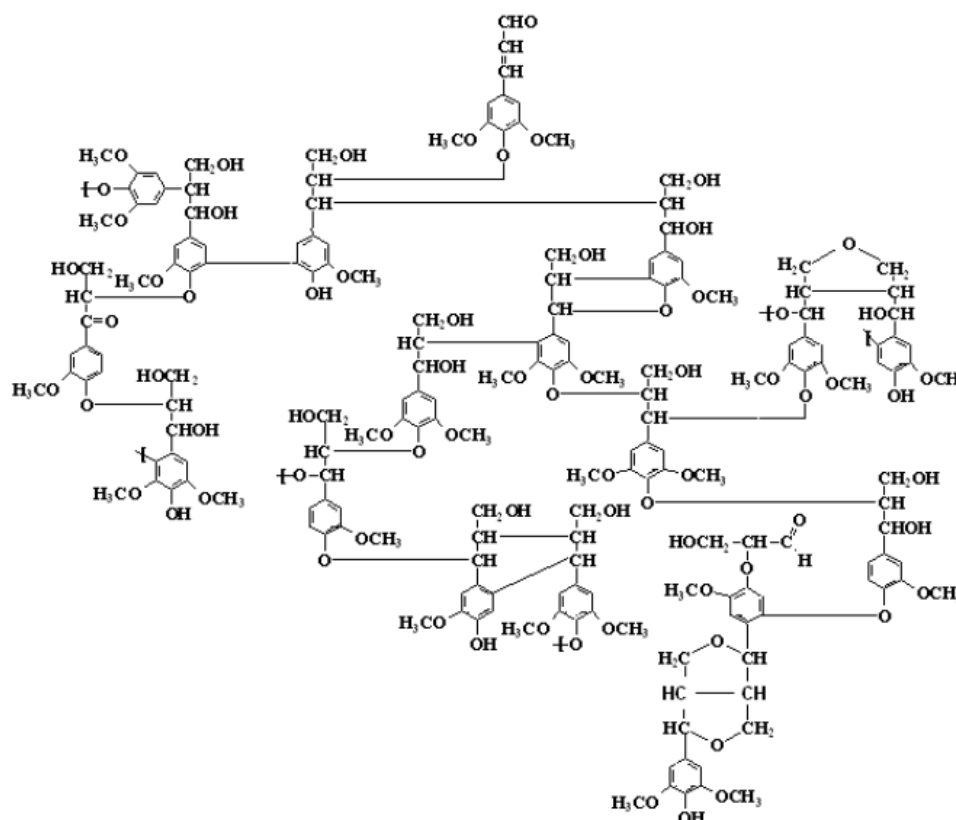


Fonte: (D'ALMEIDA, 1988).

A estrutura da lignina é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes as β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, β - β e β -O-5 (HIGUCHI, 1985). Um modelo proposto para a lignina é mostrado na Figura 8.

Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a ação microbiana sobre o material (FAN *et al.*, 1987).

Figura 8 – Representação esquemática da Lignina.



Fonte: (FENGEL e WEGENER, 1989).

A interação entre a lignina, celulose e hemicelulose determinam a ultra-estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos.

2.2. ACEROLA

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Sua produção superou 43 milhões de toneladas em 2008, o que representa 5 % da produção mundial. Com esse saldo o país fica atrás apenas da China e da Índia. Cerca de 53 % da produção brasileira é destinada ao mercado de frutas processadas e 47 % ao mercado de frutas frescas. Existe um mercado externo potencial acessível à fruticultura brasileira de 28,3 milhões de toneladas (SEBRAE, 2009).

A acerola ou cereja-das-antilhas é uma fruta vermelha (Figura 9) originária da América Central (MARINO NETO, 1986), cujo consumo tem crescido nas últimas décadas, graças aos seus constituintes com propriedades antioxidantes, o seu alto teor de

ácido ascórbico, assim como a presença de antocianina, principal pigmentos da acerola (LIMA *et al.*, 2003).

Figura 9 – Fruto Acerola.



A cultura da acerola foi introduzida no Brasil na década de 50. A cultura se adaptou bem às condições de clima tropicais e subtropicais, propagando-se a quase todo o território nacional. Somente após a década de 80, a cultura apresentou expansão de sua área cultivada para fins comerciais, impulsionada pela demanda do mercado interno e externo. Nessa época foi registrado o início das exportações de frutos *in natura* (FREIRE, 1995; COSTA e ANDRADE, 2003). Em algumas regiões a cultura se desenvolveu de forma comercial, como foi o caso de Pernambuco (7.625 t), Ceará (4.724 t), São Paulo (3.759 t) e Bahia (3.458 t), de acordo com o Censo Agropecuário de 1996 (IBGE, 2009).

O Brasil tem expandido suas áreas de cultivo de acerola, a ponto de se tornar o principal produtor e exportador mundial desta fruta (MEZADRI *et al.*, 2006). As formas mais comuns de comercialização são: frutos *in natura* congelados, polpa congelada e suco engarrafado (YAMASHITA *et al.*, 2003).

No caso do resíduo da acerola, estima-se que cerca de 34,4 mil toneladas desse fruto por ano são processados nas indústrias brasileiras, o que equivale a 7,16 % do total de frutas colhidas no país (ALDRIGUE *et al.*, 2002). As acerolas processadas geram

aproximadamente 18 mil toneladas de sucos e polpas por ano, concentrando-se esta produção na região Nordeste (FREITAS *et al.*, 2006).

O sucesso da industrialização da acerola é creditado à quantidade de polpa comestível que a fruta produz. O restante, bagaço, cascas e sementes, que representam cerca de 15 à 41 % do volume total de toda a acerola processada é desprezado no processo fabril, considerado custo operacional para as empresas (AGUIAR *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2002), e é descartado sem os devidos cuidados.

Vários estudos sobre a composição dos resíduos agroindustriais de frutas têm sido realizados com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados. Para agregar-lhes valor, é necessário o conhecimento dos seus constituintes, através da investigação científica e tecnológica (VIEIRA *et al.*, 2009). A composição química da acerola depende das espécies, condições ambientais e também do estágio de maturação do fruto.

Na Tabela 3 estão apresentadas as caracterizações físico-químicas dos resíduos agroindustriais do processamento das frutas: mangaba, acerola e graviola.

Tabela 3 – Caracterização físico-química dos resíduos da mangaba, acerola e graviola.

PROPRIEDADES	RESÍDUO		
	MANGABA	ACEROLA	GRAVIOLA
UMIDADE	6,03±0,17	8,97±0,37	6,67±0,19
CINZAS	0,98±0,02	0,97±0,00	0,98±0,00
pH	4,03±0,01	3,23±0,01	4,43±0,02
ACIDEZ	11,05±1,23	35,00±0,06	8,9±1,23
BRIX	1,08±0,14	2,17±0,14	1,25±0,00
ACIDEZ/BRIX	0,10	0,06	0,05
LIPÍDIOS	8,1±0,30	1,26±0,20	5,35±0,32
FIBRAS	31,73±1,06	26,4±0,02	31,37±1,35
AÇÚCARES REDUTORES	4,81±0,02	16,13±0,36	7,03±0,13
PROTEÍNA	9,95±0,02	6,86±0,10	10,78±1,09

Fonte: (SILVA *et al.*, 2012).

A Tabela 4 mostra a composição físico-química de subprodutos da acerola. Esses subprodutos da acerola foram compostos basicamente de sementes e mais uma pequena percentagem de fruto descartado (LOUSADA JR *et al.*, 2006).

Tabela 4 – Composição físico-química e percentagem de matéria seca de subprodutos da acerola.

COMPONENTES (%)	SUBPRODUTO DA ACEROLA
Matéria Seca	85,07
Proteína Bruta	10,54
Fibra Detergente Neutro	71,87
Fibra Detergente Ácido	54,70
Celulose	35,07
Hemicelulose	17,17
Lignina	20,11

Fonte: (LOUSADA JR *et al.*, 2006).

Quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, observa-se o quanto a acerola é um material lignocelulósico, com uma grande quantidade de celulose, que pode ser convertida em glicose através da hidrólise enzimática.

2.3. PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

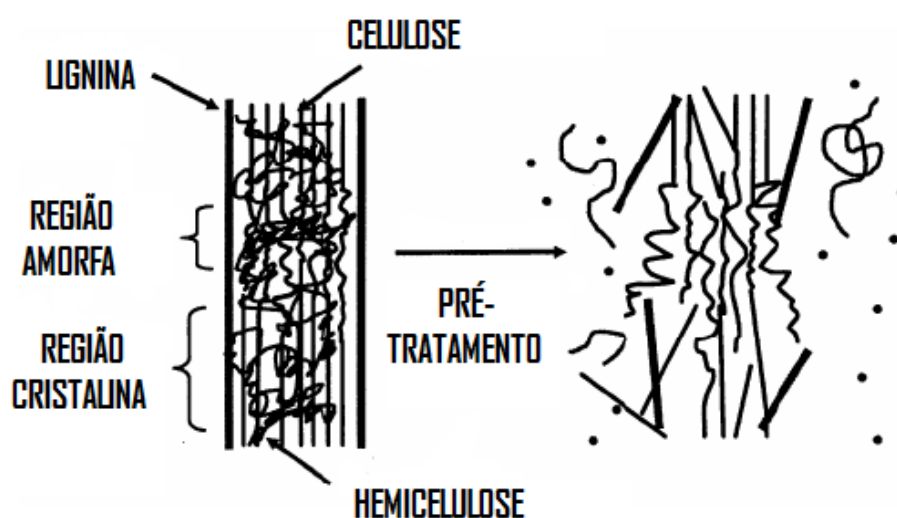
Os métodos de pré-tratamento se referem à solubilização e a separação de um ou mais componentes da biomassa lignocelulósica. Devido à natureza cristalina da celulose, a barreira física formada por ligninas ao redor das fibras celulósicas e a presença de complexas interações entre hemicelulose e celulose presentes nas paredes celulares dos vegetais e entre estes polissacarídeos e ligninas, o pré-tratamento desse material representa uma etapa imprescindível na rota de produção, pois objetiva separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar sua fração amorfa e solubilizar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose para que fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas (SARKAR *et al.*, 2012).

Tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma barreira física contra o ataque à celulose, sendo que a lignina é um dos principais fatores que limitam a

hidrólise enzimática da celulose (BERLIN *et al.*, 2005), pois as celulases adsorvem irreversivelmente à superfície da lignina permitindo apenas que pequenas quantidades destas enzimas sejam adsorvidas na celulose (MANSFIELD *et al.*, 1999; PALONEN *et al.*, 2004).

Os principais objetivos do pré-tratamento são: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quanto na etapa de fermentação (HSU, 1996). A Figura 10 apresenta de forma generalizada a ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.

Figura 10 – Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.



Fonte: (HSU *et al.*, 1980).

Muitos métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos têm sido utilizados antes da hidrólise enzimática. Esses métodos podem ser classificados em pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (Tabela 5) (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Tabela 5 – Classificação dos Pré-Tratamentos.

CATEGORIA	EXEMPLOS
Físicos	Moagem, Microondas
Químicos	Ácidos, Álcalis, Solventes Orgânicos, Peróxidos e Ozônio
Físico-Químicos	Explosão a Vapor, APEX, e Explosão com CO ₂
Biológicos	Decomposição Microbiana de Lignina

Fonte: (RODRIGUES, 2010).

Embora exista uma grande variedade de métodos de pré-tratamento do material lignocelulósico, a escolha deve contemplar à minimização da degradação dos carboidratos e produção de inibidores e produtos tóxicos aos microrganismos fermentativos (REZENDE *et al.*, 2011).

Dos vários processos descritos na literatura, os mais comuns são baseados no emprego de álcali, ácidos, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida (*Ammonia Fibre Explosion* ou APEX) e hidróxido de sódio, todos com o propósito de degradar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa (GÁMEZ *et al.*, 2006; LASER *et al.*, 2002; CUNHA e SILVA, 2001).

Neste sentido, os principais métodos de pré-tratamento estão representados junto aos pré-tratamentos alcalinos e ácidos associados à temperatura (BETANCUR e PEREIRA, 2010). As diferenças entre estes dois tipos de pré-tratamentos está relacionada aos agentes químicos utilizados e conseqüentemente aos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular.

2.3.1. Pré-Tratamento Ácido

Os pré-tratamentos catalisados por ácidos têm sido considerados um dos mais efetivos além de economicamente viáveis (REZENDE *et al.*, 2011). Estes pré-

tratamentos podem ser conduzidos com ácidos diluídos ou concentrados, mas a utilização de ácidos concentrados tem sido evitada devido à formação de compostos inibidores. Portanto, o uso de ácidos diluídos é o método mais favorável de pré-tratamento para a utilização industrial e tem sido usado em uma série de resíduos lignocelulósicos (ALVIRA *et al.*, 2010).

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

No Brasil, os reagentes ácidos mais utilizados são ácidos sulfúricos, clorídricos e nítricos (concentrados ou diluídos). O pré-tratamento com ácido sulfúrico pode alcançar elevadas taxas de reação e, com isso atingir o objetivo de melhorar a hidrólise da celulose. Esses processos podem ser diferenciados de acordo com as temperaturas aplicadas. As temperaturas superiores a 160 °C são consideradas altas temperaturas, e quando se usam temperaturas menores, são classificados como, baixas temperaturas. Também é necessária a neutralização do hidrolisado para as etapas subseqüentes de hidrólise enzimática e fermentação (SUN e CHENG, 2002).

2.3.2. Pré-Tratamento Básico

Algumas bases também podem ser utilizadas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito desse processo depende da quantidade de lignina presente nos materiais (McMILLIAN, 1994). Processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com sistemas ácidos (BAUDEL, 2006).

O pré-tratamento alcalino envolve o uso de bases, tais como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e hidróxido de amônio. O uso de um álcali provoca a degradação do éster e das cadeias glicosídicas, resultando na alteração estrutural da lignina, inchaço da celulose, descristalização parcial de celulose e parcial da hemicelulose (BRODEUR *et. al.*, 2011).

Comparado com o tratamento ácido, o tratamento alcalino apresenta-se mais efetivo na quebra das ligações entre celulose, hemicelulose e lignina, além de promover a fragmentação dos polímeros de hemicelulose (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Em vários estudos o tratamento alcalino tem sido empregado utilizando-se solução de NaOH (CHAHAL, 1985; AGUIAR e MENEZES, 2000; OJUMU *et al.*, 2003; MUTHUVELAYUDHAM e VIRUTHAGIRI, 2006; JA'AFARU e FAGADE, 2007).

As vantagens do uso do álcali sobre os métodos ácidos são as condições mais amenas e a remoção da fração de lignina, sem haver a degradação dos outros componentes importantes (BALAT *et al.*, 2008).

2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A sacarificação dos resíduos lignocelulósicos pré-tratados pode ser realizada por ação de ácidos ou enzimas celulolíticas. Em ambos os processos de hidrólise, a celulose é convertida em glicose conforme a Equação 1 (NASCIMENTO, 2011).



Na hidrólise convencional, a hemicelulose é hidrolisada sob condições ácidas moderadas, enquanto a celulose semicristalina recalcitrante exige condições drásticas (ácido concentrado, altas temperaturas). A exigência de condições drásticas relacionadas à hidrólise ácida do material lignocelulósico, principalmente da celulose, leva a decomposição de açúcares em compostos inibidores da etapa fermentativa. Com isso, o uso de celulasas nos processos de sacarificação de biomassa para produção de etanol vem sendo amplamente desenvolvido com a finalidade de um melhor aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, uma vez que com a utilização destas enzimas não ocorre formação de inibidores (MIELENZ, 2001).

Processos catalisados por enzimas são objeto da maior parte dos estudos efetuados atualmente a nível mundial; em princípio, por oferecerem maior conversão e um grande potencial de redução de custos a médio/longo prazo. Normalmente, a hidrólise enzimática sem um tratamento prévio resulta num rendimento em açúcares inferior a 20 % da quantidade máxima teórica, enquanto a aplicação de um pré-

tratamento resulta num rendimento em açúcares superior a 90 %. Assim, a aplicação de um pré-tratamento antes da hidrólise enzimática é necessária para a obtenção do máximo rendimento em açúcares (KUMAR *et al.*, 2009).

As condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação enzimática e relação sólido-líquido dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso (RABELO, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é normalmente realizada por celulases. As celulases podem ser produzidas por diversas espécies bacterianas como o *Clostridium*, *Cellulomonas* e *Bacillus* (BISARIA, 1998), no entanto as celulases fúngicas têm melhor potencial para uso em escala comercial (DUFF e MURRAY, 1996). Atualmente, sabe-se que o complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases (FAN *et al.*, 1987; CLAEYSSSENS e TOME, 1989).

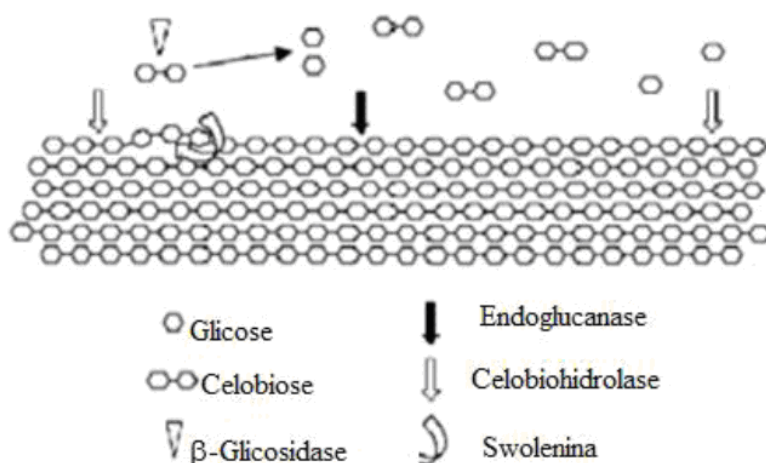
As endo-(1,4)- β -D-glucanases (endoglucanase, carboximetilcelulase ou endocelulase) hidrolisam ligações internas (β -1,4), preferencialmente nas regiões amorfas que são mais suscetíveis, reduzindo o grau de polimerização deste substrato, produzindo terminais reduzidos (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e não-reduzidos (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente). Sua atuação expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases (ARO *et al.*, 2005; CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

O grupo das exoglucanases é constituído principalmente por celobiohidrolase e glucanohidrolase, capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A celobiohidrolase ou exo-endo-1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase participa da hidrólise primária da fibra e promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto as outras celulases (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

O último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glucosidade que por sua vez hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis a glicose (CASTRO e PEREIRA JR, 2010; OGEDA e PETRI, 2010).

A Figura 11 apresenta uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 11 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose com geração de glicose.



Fonte: (CARVALHO *et al.*, 2009).

Considerando as características estruturais da celulose, verifica-se que o modo de ação das enzimas influencia a taxa de reação. A susceptibilidade da celulose ao ataque enzimático é determinada pela acessibilidade dos sítios de ligação a celulose, o que determina a subsequente adsorção da enzima no substrato sólido. A representação abaixo descreve um plano hipotético para a degradação da celulose.

- Etapa 1:
Celulose nativa → (endoglucanase) → Celulose ativa
- Etapa 2:
Celulose ativa → (exoglucanase) → Celobiose
- Etapa 3:
Celobiose → (β -glucosidase) → glicose

A adsorção das enzimas celulases e a concepção do complexo enzima/substrato são apreciadas como os passos cruciais na hidrólise enzimática de celulose (SILVA, 2010).

As cargas da enzima celulase utilizadas na hidrólise variam entre 7-33 FPU/g de substrato, dependendo do tipo e da concentração de substrato (SUN e CHENG, 2002).

O aumento da dosagem de celulases no processo pode melhorar o rendimento e taxa de hidrólise, mas aumentaria significativamente o custo do processo. A dosagem de celulase de 10 FPU/g de celulose é frequentemente utilizada em estudos de laboratório, pois fornece um perfil de hidrólise com elevados níveis de produção de glicose num período de tempo razoável (48-72 h), a um custo razoável de enzima (GREEG e SADDLER, 1996).

A hidrólise enzimática da celulose e conversão de açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol, podem ser conduzidas de forma sequencial (processo HSF, hidrólise separada da fermentação) ou simultânea (SSF, sacarificação simultânea a fermentação) (BORTOLAZZO, 2011).

Na hidrólise enzimática há maior produção de monossacarídeos do que na hidrólise com ácido diluído, porque as enzimas celulases catalisam somente reações de hidrólise e não reações de degradação de açúcares (PARISI, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, da Unidade Acadêmica de Engenharia Química, do Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Federal de Campina Grande, PB.

A Figura 12 mostra um fluxograma das etapas realizadas no resíduo de acerola para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Figura 12 – Fluxograma para obtenção de açúcares fermentescíveis.



3.1. MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o resíduo de acerola, substrato lignocelulósico, cedido pela indústria de beneficiamento de frutas NIAGRO - Nichirei do Brasil Agrícola Ltda., localizada no distrito industrial em Petrolina/PE. O resíduo foi coletado no Decanter modelo SC 4506076 e transportado imediatamente para o Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) do IF Sertão-PE. A Figura 13 mostra uma amostra do resíduo de acerola obtido do Decanter.

Figura 13 - Resíduo de Acerola obtido no Decanter.



O resíduo foi preparado em três etapas: secagem, moagem e armazenamento. A secagem foi realizada em um secador de bandejas com circulação forçada de ar e temperatura de 55 °C até que fosse atingida massa constante. Em seguida, o resíduo foi devidamente triturado, utilizando-se um moinho de facas, visando-se obter partículas menores e homogêneas (Figura 14) e posteriormente acondicionado a vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade (Figura 15).

Figura 14 - Resíduo de Acerola Seco e Moído.



Figura 15 - Resíduo de Acerola embalado á Vácuo.



3.1.1. Enzimas

As enzimas comerciais utilizadas neste trabalho corresponde a preparações comerciais da enzima Celluclast 1.5 L (endoglucanase e exoglucanase) da Novozyme e a Poercell (alta atividade da β -glucosidase) da Prozyn.

3.2. CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DO MATERIAL

A caracterização do bagaço de acerola foi realizada tanto para o resíduo *in natura* como também para o resíduo pré-tratado, em triplicata, e feita quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, α -celulose e hemicelulose.

A metodologia utilizada nesta caracterização foi de acordo com Moraes et al. (2010), que se basearam nas normas TAPPI.

3.2.1. Umidade

Para a realização desta análise utilizaram-se cadinhos de porcelana, que foram lavados e secos na estufa. Estes foram mantidos em dessecador com sílica gel por 30 minutos, e em seguida, foram pesados em uma balança analítica com precisão de 0,0001 g, obtendo-se assim a massa de cada recipiente. Dentro de cada cadinho foram colocados aproximadamente de 2 a 4 g do material, e o conjunto cadinho-material foi levado à estufa a 105 °C, por 24 horas.

Decorrido esse tempo, o conjunto foi retirado e posto em um dessecador, para resfriar a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o conjunto foi pesado e sua massa rapidamente anotada para obtenção do teor de umidade conforme Equação 2:

$$U (\%) = \frac{(MRAU - MRAS)}{MAU} 100 \quad (2)$$

Onde:

MAU = Massa da amostra úmida;

MRAU = Massa do conjunto recipiente (MR)/Amostra úmida (AU);

MRAS = Massa do conjunto recipiente (MR)/Amostra seca (AS).

3.2.2. Cinzas

Para a análise do teor de cinzas totais foi utilizado um forno mufla e o conjunto cadinho-material resultante da análise feita para a verificação do teor de umidade.

O conjunto foi colocado, inicialmente, na mufla à temperatura ambiente, e para o aquecimento da amostra utilizou-se uma rampa de aquecimento de aproximadamente 9,6 °C/min, para que a temperatura de trabalho de 600 °C fosse atingida após 1 hora de aquecimento. Essa temperatura foi mantida por quatro horas, e, ao final desse tempo, a temperatura da mufla foi regulada para 200 °C onde permaneceu por mais 1 hora.

Em seguida, o conjunto cadinho-material calcinado (Figura 16) foi colocado em um dessecador, onde permaneceu por 30 minutos. Depois desse tempo foi pesado em uma balança analítica para a verificação da massa de cinzas.

Figura 16 – Conjunto Cadinho/Material depois de Calcinado.



Para a obtenção do teor de cinzas totais, utilizou-se a Equação 3:

$$\text{Cinzas(\%)} = \frac{(\text{MRAC} - \text{MR})}{\text{MA}} 100 \quad (3)$$

Onde:

MRAC = Massa do conjunto recipiente (MR)/Amostra calcinada (AC);

MR = Massa do recipiente;

MA = Massa da amostra.

3.2.3. Extrativos

Iniciou-se esta análise pesando um papel de filtro previamente seco em estufa a 105 °C e resfriado à temperatura ambiente em dessecador. Em seguida, foram pesadas cerca de 5,0 g da matéria vegetal bruta e seca, e este material foi colocado dentro do papel filtro. Feito isso, o conjunto papel-material foi dobrado, formando-se um cartucho e depositado dentro de um Soxhlet. Montou-se o sistema de extração, unindo-se o aparelho de Soxhlet a um condensador de bolas e um balão volumétrico de fundo redondo de 250 mL no qual foram adicionados 100 mL de álcool etílico e 100 mL de hexano como solventes extratores.

Após isso, o conjunto foi colocado em uma manta aquecedora, permanecendo assim por um período de 6 horas de extração (Figura 17).

Figura 17 - Sistema de Extração.



Depois desse tempo, o balão foi removido, e o seu conteúdo (solvente e extrativos) armazenado para posterior utilização. O cartucho de papel foi posto em uma estufa a 105 °C por 24 horas. Passado esse tempo foi colocado em um dessecador por 30 minutos para que atingisse a temperatura ambiente e pesado em balança analítica.

Para a obtenção do teor de extrativos utilizou-se a Equação 4:

$$E(\%) = \frac{(MRES - MRRS)}{MA} 100 \quad (4)$$

Onde:

MRES = Massa do conjunto recipiente/extrativos secos;

MRRS = Massa do conjunto recipiente (MR)/Resíduo de solvente (RS);

MA = Massa da amostra.

3.2.4. Lignina

Na determinação de lignina utilizou-se cerca de 1,0 g da amostra na sua forma sem extrativos. O material foi colocado em um almofariz, onde foram adicionados 17,0 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m), resfriado em geladeira a 15 °C, antes do uso.

Após a adição do ácido, o material foi triturado por 15 minutos cuidadosamente com um pistilo, até que não houvesse mais partículas visíveis não solubilizadas. Após este procedimento, o material foi deixado em descanso por 24 horas.

Passadas às 24 horas, para o processo de digestão foram adicionadas 306 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4 % (m/m). Feito isso, o conteúdo foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL. Depois, o balão foi conectado ao mesmo sistema utilizado para a determinação de extrativos.

O material foi mantido sob aquecimento e refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura do conteúdo presente no balão. Ao término desse tempo, o aquecimento foi desligado e esperou-se alguns minutos até o balão atingir a temperatura ambiente.

Antes de completar às 24 horas, colocou-se um funil de vidro por uma hora na estufa a 105 °C, em seguida foi resfriado em dessecador e pesado. O funil foi colocado sobre um kitassato de 1.000 mL, usando-se um conector feito de borracha um pouco

maior do que a abertura superior do kitassato, com um espaço interno vazado para colocar o funil.

Por fim, conectou-se o kitassato com o funil através de uma mangueira a outro kitassato e esse com outra mangueira a bomba, para que assim formasse um sistema de vácuo para facilitar a filtração.

O material contido no balão foi aos poucos sendo transferido para o funil, com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do funil. A bomba foi ligada para facilitar o processo. Após a transferência de todo o material contido no balão volumétrico, este foi lavado com mais água destilada, para que nenhum resquício de lignina insolúvel fosse perdido.

O precipitado recolhido no funil foi enxaguado com água destilada até que o filtrado estivesse com o pH próximo ao da água utilizada. Utilizou-se um pHmêtro digital para fazer a leitura do pH. Em seguida, o funil foi levado para uma estufa a 105 °C por 24 horas. Após resfriado em dessecador foi pesado em balança analítica.

Para a obtenção do teor de lignina insolúvel utilizou-se a Equação 5:

$$LI(\%) = \frac{(MFL - MF)}{MA} 100 \quad (5)$$

Onde:

MFL = Massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MA = Massa da amostra.

3.2.5. Holocelulose

Para a determinação da holocelulose, primeiramente em um erlenmeyer de 500 mL, foram pesados 3,0 g do material vegetal, sem umidade e extrativos. Em seguida adicionados 2,5 g de clorito de sódio (NaClO₂), com pureza aproximada de 80 %, 120 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza ≥ 99,85 %. Foi colocada uma barra magnética para garantir uma agitação constante durante a reação. Em uma capela de exaustão, preparou-se um banho-maria, mantendo-se a temperatura constante a 70 °C.

O conjunto erlenmeyer/reagentes foi tampado com um erlenmeyer de 25 mL e mergulhado no banho, o qual foi mantido aquecido uniformemente sobre um agitador magnético ligado (Figura 18).

Figura 18 – Sistema utilizado para realização da Reação.



Após o tempo de 1 hora foi realizada uma nova adição de 1 mL de ácido acético. Em seguida, decorrida mais uma hora adicionou mais 1 mL do ácido ao conjunto, prosseguindo-se com o aquecimento em banho por mais três horas. No decorrer do aquecimento, foi percebida a elevação de cloro, que foi observada pela formação de um gás amarelo-esverdeado dentro do erlenmeyer (Figura 19).

Figura 19 – Formação de Gás Cloro no decorrer da Reação.



No decorrer do tempo de reação, foi preparado o mesmo sistema de filtração utilizado para determinação da holocelulose. Um funil de vidro foi colocado para secar por 1 hora na estufa a 105 °C. Em seguida, o funil foi removido com pinças e colocado em um dessecador para esfriar. Logo após o mesmo foi pesado em balança analítica e sua massa anotada.

O funil foi acoplado a um kitassato de 1000 mL, usando-se um conector feito de borracha cortada um pouco maior do que a abertura superior do frasco, com um espaço interno vazado por onde o funil foi adaptado.

Encerrado o período de reação mais aquecimento, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para o funil com uma agitação constante evitando assim a perda de precipitado no interior do erlenmeyer. A filtração foi iniciada, formando uma pequena pressão com a palma da mão para originar um vácuo que pressionava o líquido a descer através do funil.

O precipitado recolhido no funil foi lavado com água destilada e transferido para uma estufa a 105 °C, onde permaneceu por 24 horas, a fim de que o material obtido fosse completamente seco. Após a secagem, colocou-se o conjunto funil-holocelulose em um dessecador por 30 minutos, em seguida foram pesados e sua massa anotada.

Para a obtenção do teor de holocelulose utilizou-se a Equação 6:

$$H(\%) = \frac{(MFH - MF)}{MA} 100 \quad (6)$$

Onde:

MFH = Massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MA = Massa da amostra.

Como os dados de holocelulose se referem à massa da amostra seca e sem extrativos, logo, foi necessário realizar mais um cálculo, a fim de corrigir os valores do material original. O teor de holocelulose corrigido foi calculado pela Equação 7:

$$H(\%)_{\text{corrigido}} = \frac{H(\%)[100 - (E(\%) + U(\%))]}{100} \quad (7)$$

3.2.6. α -celulose

Inicialmente colocou-se um funil de vidro com capacidade de 50 mL na estufa a 105 °C e após 1 hora o mesmo foi retirado da estufa e colocado em um dessecador por 30 minutos. Passado esse tempo o funil foi pesado e sua massa anotada. Em seguida montou-se o sistema de filtração a vácuo.

Pesou-se cerca de 1,0 g da holocelulose seca em um almofariz à temperatura ambiente. Foram adicionados 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 17,5 % (m/v) e aguardou-se dois minutos de contato entre a solução e o material. Após esse contato, triturou-se o material por oito minutos. Com o término desse tempo foram acrescentados 40 mL de água destilada ao almofariz e o conteúdo transferido para o funil com agitação constante. O almofariz foi bem lavado com água destilada, sendo todo o material transferido para o funil. A filtração foi iniciada através de uma pressão conseguida com a palma da mão sobre a superfície do funil. O precipitado recolhido no funil foi lavado várias vezes com água destilada.

Após a filtração, o funil foi levado para uma estufa a 105 °C, onde permaneceu por 24 horas. Decorrido esse tempo o conjunto funil/ α -celulose foi colocado em um dessecador por 30 minutos para atingir a temperatura ambiente e em seguida pesado e sua massa anotada.

Para obtenção do teor de α -celulose utilizou-se a Equação 8:

$$A(\%) = \frac{(MFA - MF)}{MA} 100 \quad (8)$$

Onde:

MFA = Massa do funil somada à massa de α -celulose, após a secagem em estufa;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MAH = Massa da amostra de holocelulose.

Para obter o teor corrigido de α -celulose ($A(\%)_{\text{corrigido}}$), com base no teor corrigido de holocelulose ($H(\%)_{\text{corrigido}}$), foi utilizada a Equação 9 para a realização deste cálculo:

$$A(\%)_{\text{corrigido}} = \frac{(H(\%)_{\text{corrigido}} A(\%))}{100} \quad (9)$$

E por meio do cálculo da diferença entre os valores de holocelulose e α -celulose corrigidos, foi calculado o valor do teor percentual corrigido de hemicelulose ($HeC(\%)_{corrigido}$), dado pela Equação 10:

$$H(\%)_{corrigido} - A(\%)_{corrigido} = HeC(\%)_{corrigido} \quad (10)$$

3.3. CARACTERIZAÇÃO MICROESTUTURAL

3.3.1. Difração de Raios X (DRX)

As análises por difração de raios X foram realizadas para o bagaço *in natura* e pré-tratado em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD 600 com fonte de radiação $CuK\alpha$, tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, tamanho do passo de 0,020 e tempo por passo de 0,60 segundos. A velocidade de 2° min^{-1} e faixa de varredura de $2\theta = 10$ a 50° . As análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento de Novos Materiais (LABNOV) pertencente à Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura da marca Shimadzu, modelo SSX-550 acoplado a um Espectrofotômetro de Energia Dispersiva (EDS). O procedimento de análise consistiu na preparação de aproximadamente 5 mg de amostra dispersa em 5 mL de acetona e homogeneizada manualmente. Com o auxílio de um conta-gotas, uma gota da amostra foi depositada sobre a superfície de um porta-amostra. Em seguida, o porta-amostra contendo a amostra a ser analisada foi submetido a uma metalização, em um metalizador modelo SC-701 e marca Sanyu Electron para ser recoberto por uma fina camada de ouro com o objetivo de proporcionar uma condutividade elétrica necessária para a análise. Esta análise foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). As microscopias eletrônicas de varredura foram realizadas com ampliação de faixa de 50 a 3.000 vezes, e realizadas para o bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado.

3.4. PRÉ-TRATAMENTO

A metodologia utilizada no pré-tratamento foi uma adaptação para a matéria-prima bagaço de acerola, através da metodologia empregada no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (BAUDEL, 2006).

Foram realizados dois pré-tratamentos, um pré-tratamento ácido e um pré-tratamento básico, com intuito de remover hemicelulose e lignina do bagaço de acerola.

3.4.1. Pré-Tratamento Ácido

O pré-tratamento ácido do bagaço de acerola foi realizado em um forno da MAINTEC FORNOS INTI com um reator de aço inox pressurizado com controlador térmico de temperatura interna e externa, e capacidade máxima de 750 mL de solução.

O ácido sulfúrico foi utilizado como catalisador e a razão de sólido para líquido utilizada foi de 1 g de bagaço por 10 mL de ácido. Inicialmente pesou-se 60 g do bagaço in natura para ser colocada dentro do reator juntamente com 600 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 3 %. A temperatura do pré-tratamento foi de 120 °C e o tempo de reação de 1 hora (LEÃO *et al.*, 2013). Decorrido esse tempo o material dentro do reator foi filtrado e bem lavado com água destilada. Em seguida foi colocado para secar em uma estufa a 60 °C por 24 horas. Esse procedimento foi realizado duas vezes.

3.4.2. Pré-Tratamento Básico

O material resultante do pré-tratamento ácido foi transferido para o reator pressurizado em seguida adicionou-se a solução de hidróxido de sódio (NaOH) à 4 % na razão de 1:10 material/solução. A reação ocorreu à temperatura de 120 °C por 1 hora. Em seguida o material foi filtrado, lavado com água destilada até o pH se igualar ao da água de lavagem e seco a 60 °C até massa constante (JA'AFARU e FAGADE, 2007).

3.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática do bagaço de acerola, *in natura* e pré-tratado, foi realizada com o auxílio de um planejamento fatorial 2^2 com a adição de três pontos centrais, onde verificou-se a influência de duas variáveis: carga enzimática e porcentagem de massa seca de bagaço de acerola por volume reacional no aumento da concentração de glicose na solução.

A hidrólise foi realizada em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo o bagaço de acerola, a solução tampão citrato de sódio (50 mmol/L e pH 4,8), o extrato enzimático, a β -glucosidase e a tetraciclina, como antibiótico, nas condições do planejamento experimental, mantidas em uma incubadora shaker, modelo SP – 223, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50°C, durante 72 horas.

A Tabela 6 mostra a matriz do planejamento fatorial completo e na Tabela 7 os níveis das variáveis de entrada codificados e reais.

Tabela 6 - Matriz de Planejamento Fatorial 2^2 .

Condições	Carga enzimática	Porcentagem massa seca de bagaço de acerola por volume reacional
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Tabela 7 - Níveis Codificados e Reais das Variáveis Independentes para o Planejamento Fatorial.

Variáveis	-1	0	1
Carga enzimática (FPU/g)	10	17,5	25
Porcentagem massa seca de bagaço de acerola por volume reacional (%)	2	3	4

Os valores escolhidos para os níveis reais das variáveis carga enzimática e relação massa seca de bagaço por volume reacional foram conforme o trabalho de Silva (2010).

Para cada experimento foram retiradas amostras depois de transcorridos os seguintes tempos (6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas) visando o estudo da cinética da hidrólise enzimática.

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado a partir do percentual do aumento de glicose conforme Equação 11:

$$\% \text{ Aumento de Glicose} = \frac{\text{Quantidade de Glicose Produzida (g/L)}}{\text{Quantidade teórica de Glicose Produzida (g/L)}} 100\% \quad (11)$$

3.5.1. Preparação do Extrato Enzimático Utilizado na Hidrólise

O extrato utilizado na hidrólise enzimática do bagaço de acerola foi preparado na proporção de 1:10, ou seja, utilizou-se 50 mL da enzima Celluclast 1.5L da Novozyme aferidos em um balão volumétrico de 500 mL com tampão citrato (50 mmol/L e pH = 4,8).

3.5.2. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia proposta por Ghose (1987), que mede a atividade celulolítica em termos de unidades de papel de filtro por mililitro da solução enzimática original.

Na determinação da atividade enzimática, os tubos de ensaios continham 50 mg do substrato (Papel de filtro quantitativo de 80 g/m²; cinza 0,00005 g; permeabilidade ao ar: 3 L/s m² e porosidade da maioria dos poros de 8 µm), 1 mL do tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH = 4,8) e 0,5 mL da enzima diluída. Os tubos controles da enzima não continham o substrato, bem como os tubos controle do substrato não continham a enzima. Para determinar a curva de calibração da glicose, os tubos padrões de glicose receberam 0,5 mL da diluição de glicose (3,35 mg/mL; 2,5 mg/mL 1,65 mg/mL e 1 mg/mL) e 1 mL do tampão.

Os tubos foram incubados em banho termostatzado a 50 °C por 60 min. Após o período de incubação, adicionou-se 3 mL do ácido 3-5 dinitrossalicílico (DNS) para interromper a reação enzimática. Para dosar os açúcares redutores totais os tubos foram colocados exatamente por 5 minutos em banho de água fervente. Em seguida foram resfriados e adicionados a cada tubo 20 mL de água destilada.

A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro da Agilent HP 8453 em um comprimento de onda de 540 nm. Usando a curva de calibração da glicose foi possível determinar a concentração de glicose 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), através da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima.

3.5.3. Determinação de Açúcares Redutores

As concentrações dos açúcares redutores (glicose, xilose e arabinose) no pré-tratamento e na hidrólise enzimática, foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se o HPLC. Para cada amostra foram feitas duas injeções.

Os dados do cromatógrafo e as condições das operações foram às seguintes:

- Cromatógrafo Líquido equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian);
- Injetor manual modelo 7725 (Rheodyne) com loop de 20 µL;
- Detector de índice de refração modelo ProStar 355 (Varian);
- Coluna Hi-Plex H 8 µm (300 x 7,7 mm);
- Temperatura da coluna de 60 °C;
- Fase móvel: solução de ácido sulfúrico à 0,005 mol/L com vazão de 0,6 mL/min;
- Tempo de análise: 60 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DO SUBSTRATO

A caracterização lignocelulósica do bagaço de acerola visou conhecer sua composição com relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, que são os componentes de maior interesse presente em materiais lignocelulósicos.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos para as amostras do bagaço de acerola *in natura* e depois do pré-tratamento, quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, alfacelulose e hemicelulose, bem como seus respectivos desvios padrão.

Tabela 8 – Caracterização Lignocelulósica do Bagaço de Acerola.

PARAMETROS	BAGAÇO	
	IN NATURA	PRÉ-TRATADO
UMIDADE (B.U) (%)	7,83 ± 0,08	4,56 ± 0,09
UMIDADE (B.S) (%)	8,5 ± 0,09	4,78 ± 0,09
CINZAS (%)	2,36 ± 0,01	1,54 ± 0,07
EXTRATIVOS (%)	14,5 ± 0,55	4,1 ± 0,10
LIGNINA (%)	28,37 ± 0,05	23,54 ± 0,51
HOLOCELULOSE (%)	43,97 ± 0,25	59,76 ± 0,22
ALFACELULOSE (%)	24,7 ± 1,86	49,6 ± 1,08
HEMICELULOSE (%)	19,27 ± 1,86	10,16 ± 1,08

As Figuras 20 e 21 mostram os gráficos pizza para os dados da Tabela 8, referente à constituição do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado, corrigido para um total de 100 %.

Figura 20 – Constituição do Bagaço de Acerola *in natura*.

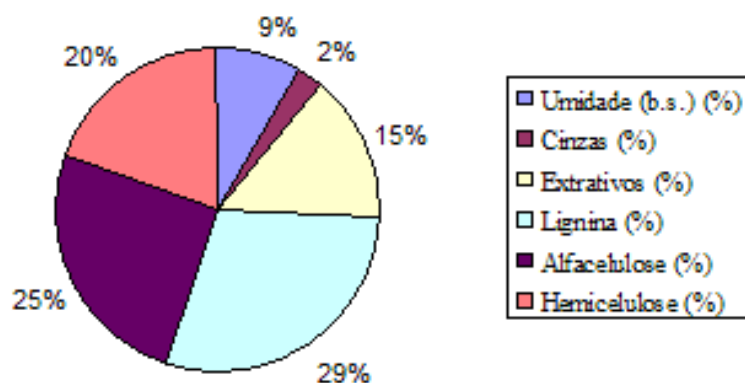
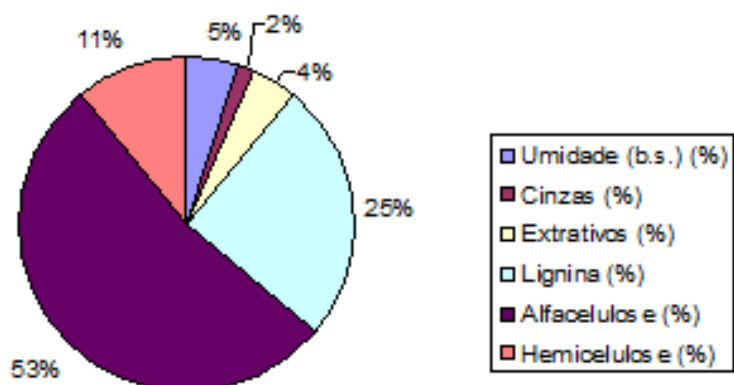


Figura 21 – Constituição do Bagaço de Acerola Pré-tratado.



A umidade encontrada para o bagaço de acerola *in natura* foi de 7,83 % para base úmida e 8,5 % para base seca, valores bem próximos ao encontrado por Silva *et al.* (2012), que foi de 8,97 %. Já o valor de cinzas foi de 2,36 %, um pouco superior ao encontrado pelos mesmos autores, que foi de 0,97 %. Mesmo sendo um pouco mais alto ainda mostra que a composição de cinzas no bagaço de acerola é bem pequena.

A parcela de extrativos no bagaço de acerola foi de 14,5 %. Este valor pode ser atribuído a diversos componentes estruturais da parede celular do material, como alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água), ácidos ou ésteres graxos, alcoóis de cadeia longa, ceras, resinas e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (MORAIS *et al.*, 2010).

Os extrativos interagem com reagentes utilizados nos processos de hidrólise e de lignificação da biomassa, bem como na quantificação da lignina presente na mesma, acarretando resultados errôneos na caracterização do material (PRADO *et al.*, 2010).

No presente estudo foi obtido os seguintes percentuais para o bagaço de acerola *in natura*: celulose (24,7 %), hemicelulose (19,27 %) e lignina (28,37 %). Lousada Jr *et al.* (2006), realizaram a caracterização físico-química de subprodutos da acerola e encontraram os seguintes valores quanto aos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina: celulose (35,07 %), hemicelulose (17,17 %) e lignina (20,11 %).

Comparando os valores desses parâmetros apresentados por Lousada Jr *et al.* (2006) obtidos neste estudo, pode-se observar valores muito próximos de hemicelulose e quanto aos valores de lignina e celulose uma diferença respectivamente de 8,26 % á mais e 10,37 % á menos.

Analisando os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina, encontrados para o bagaço de acerola *in natura*, notou-se a necessidade de se realizar um pré-tratamento, devido aos altos teores de lignina e hemicelulose que podem ser reduzidos aumentando assim o percentual de celulose para posterior conversão em glicose pela hidrólise enzimática.

Diversos autores têm mostrado que a redução do conteúdo de hemicelulose e lignina favorecem a hidrólise enzimática da fração celulósica (HUS, 1996; OHGREN *et al.*, 2006).

Através da Tabela 8 e das Figuras 20 e 21, observa-se o efeito que o pré-tratamento aplicado no bagaço de acerola *in natura* acarretou nos teores dos constituintes do mesmo, principalmente com relação aos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina.

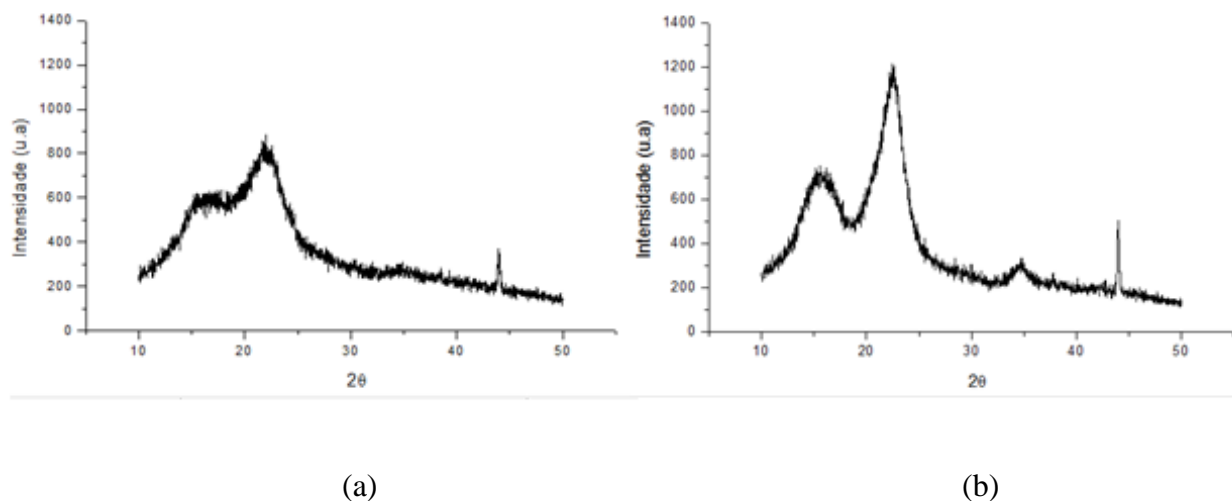
Com relação a esses três parâmetros observou-se uma redução no percentual de hemicelulose de 9,11 % e no de lignina uma redução de 4,83 %. A redução dessas quantidades nos teores de hemicelulose e lignina acarretaram um aumento de 25 % no percentual da celulose. A soma dos percentuais da hemicelulose e alfacelulose (celulose propriamente dita) compõe a holocelulose, que teve um aumento de 15,79 % após o pré-tratamento.

4.2. CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL

4.2.1. Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 22 são apresentados os resultados do difratograma de raios X, na faixa de 2θ entre 10° e 50° , para o bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado.

Figura 22 – Difratogramas: (a) Bagaço de acerola *in natura*; (b) Bagaço de acerola pré-tratado.



Pode-se observar uma maior intensidade e definição nos picos para a amostra do bagaço de acerola pré-tratado. Indicando assim uma evidência da cristalinidade do bagaço de acerola após o pré-tratamento. Essa evidência da cristalinidade está relacionada à remoção de parte da lignina e da hemicelulose, estruturas amorfas presentes nos materiais lignocelulósicos, o que expõe e permitiu um melhor empacotamento das cadeias de celulose (SIQUEIRA, 2006; ZHAO *et al.*, 2008). A não redução da cristalinidade indica que a etapa de pré-tratamento não levou a degradação de cadeias de celulose.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Nas Figuras 23 e 24 estão apresentadas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura física do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado nas ampliações de 100x, 500x, 1000x e 3000x.

Analisando de forma comparativa as micrografias do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado observa-se uma mudança na estrutura morfológica do bagaço de acerola quando submetida aos processos de pré-tratamento.

As micrografias do bagaço de acerola *in natura* mostram uma estrutura bastante fibrosa recoberta por flocos de medula. Após a etapa de pré-tratamento observa-se que as fibras ficaram mais limpas e lisas. O pré-tratamento removeu grande parte de substâncias e flocos de medula, porém manteve as fibras agrupadas sem desempacotá-las.

Figura 23 - Micrografias do bagaço de acerola *in natura*.

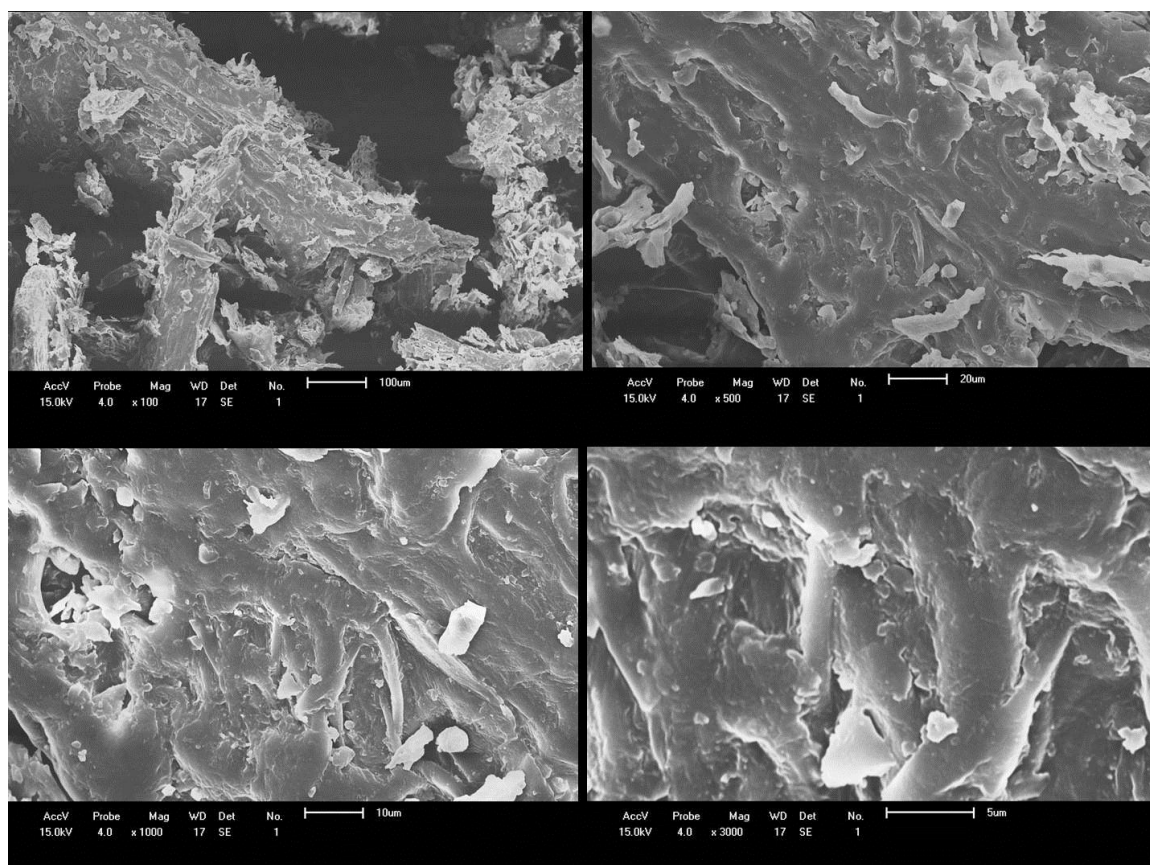
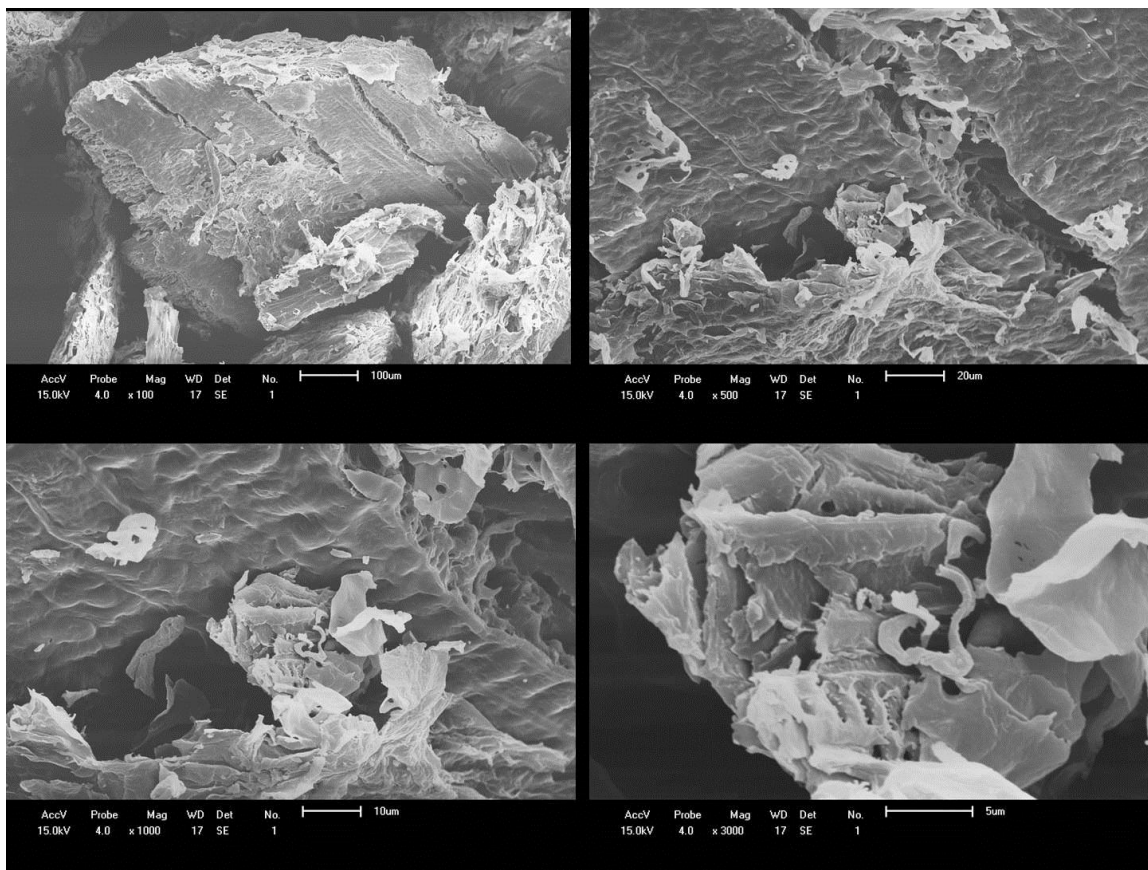


Figura 24 - Micrografias do bagaço de acerola pré-tratado.



Estas micrografias corroboram com as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa e com isso aumentando sua área superficial.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO

Na Tabela 9 encontram-se as massas das amostras após cada pré-tratamento e na Tabela 10 estão apresentados os rendimentos do pré-tratamento realizado: pré-tratamento ácido, onde utilizou-se ácido sulfúrico à 3 % seguido de um pré-tratamento básico, com hidróxido de sódio à 4 %, para uma massa de 120 gramas do bagaço de acerola *in natura*, com temperatura mantida em 120 °C e razão sólido/líquido de 1:10 (m/v). Os rendimentos foram calculados a partir da massa obtida após cada pré-tratamento em relação à massa inicial utilizada.

Tabela 9 – Massa das amostras após cada Pré-tratamento.

Massa da amostra do bagaço <i>in natura</i> (g)	120,00
Massa da amostra após o pré-tratamento ácido (g)	63,00
Massa da amostra após pré-tratamento básico (g)	27,00

Tabela 10 – Rendimento de cada Pré-tratamento.

Rendimento do pré-tratamento ácido (%)	52,50
Rendimento do pré-tratamento básico em relação ao pré-tratamento ácido (%)	42,86
Rendimento do pré-tratamento básico em relação ao <i>in natura</i> (%)	22,50

Através dos rendimentos para cada pré-tratamento utilizado, pôde-se observar uma grande perda de biomassa, ou seja, a solubilização de uma grande parte dos constituintes presentes no bagaço de acerola *in natura*. No pré-tratamento ácido foi solubilizada 47,5 % da massa inicial. No pré-tratamento básico com relação ao ácido foi solubilizada 57,14 % da massa. Já para o pré-tratado básico com relação à massa de bagaço *in natura* utilizada inicialmente, foi solubilizada 77,5 % desta massa, obtendo assim um rendimento de 22,5 %. Essa redução na biomassa provavelmente ocorreu devido aos reagentes utilizados que solubilizam parte da hemicelulose e da lignina presente no bagaço *in natura* e pelas lavagens que são feitas após cada pré-tratamento onde utiliza-se um grande volume de água destilada para promover a remoção desses reagentes, o que acarreta na solubilização de vários constituintes presente na amostra do bagaço *in natura* que não são quantificados.

Um parâmetro que comprova isso é o percentual de extrativos que inicialmente era de 14,5 % no bagaço *in natura* e depois de realizado o pré-tratamento caiu para 4,1 %.

Para um pré-tratamento ser eficaz ele tem que retirar seletivamente a hemicelulose e a lignina sem causar muitas perdas de celulose, para posterior sacarificação enzimática. Segundo Nascimento (2011), que realizou um pré-tratamento básico com NaOH á 4 % e tempo de reação de 60 minutos no bagaço de cana de açúcar, obteve uma perda de celulose em torno de 15 %.

Neste estudo observou-se uma perda de 4,5 g/L de xilose e 1,7 g/L de arabinose, frações da hemicelulose, quando realizado o pré-tratamento ácido. E no pré-tratamento básico uma perda de 1,6 g/L de ácido acético. A soma da glicose perdida no pré-tratamento ácido e alcalino aplicados nesse trabalho foi de 2,0 g/L, o que representa aproximadamente 10 % da glicose obtida após a hidrólise enzimática.

4.4. CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Antes de realizar as hidrólises enzimáticas, foi necessário determinar a atividade do extrato enzimático comercial para poder calcular as quantidades desse extrato que seriam utilizadas nas hidrólises. A atividade enzimática da enzima Celluclast 1.5 L, utilizada nas hidrólises enzimáticas do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado foram de 10,13 FPU/mL e 6,31 FPU/mL.

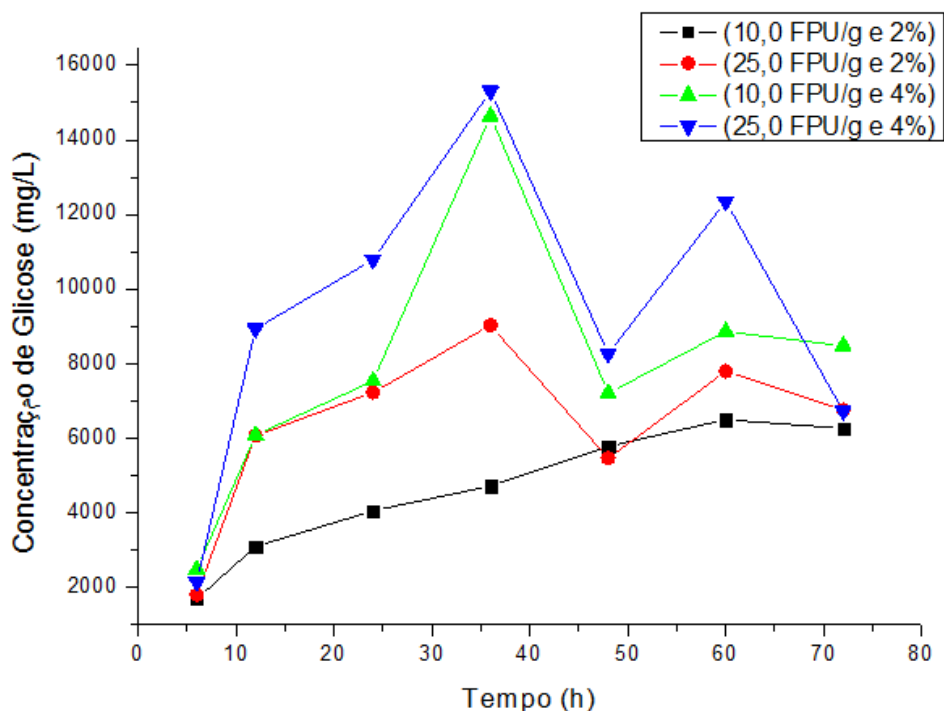
A partir deste resultado, foi possível calcular a quantidade necessária de extrato enzimático para as condições de hidrólise (Tabela A1 e A2). Esse volume de extrato foi calculado a partir do produto entre a massa do bagaço (g) e a carga enzimática (FPU/g) dividido pela atividade enzimática para cada hidrólise (FPU/mL).

Neste trabalho foram variadas as cargas enzimáticas nos valores 10, 17,5 e 25 FPU/g de bagaço de acerola. Também foi variada a porcentagem massa seca de bagaço por volume do meio reacional, entre 2 - 4 %.

As cinéticas da hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado, foram realizadas nas respectivas condições de carga enzimática e porcentagem de massa seca de bagaço por volume reacional, conduzidas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50 °C,

Nas Figuras 25 e 26, estão apresentadas as cinéticas da hidrólise enzimática para o bagaço de acerola *in natura*. Na Figura 25 as cinéticas para as condições 1, 2, 3, e 4 e na Figura 26 as cinéticas referente aos três pontos centrais (5, 6 e 7).

Figura 25 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola *in natura* para as condições 1, 2, 3 e 4.



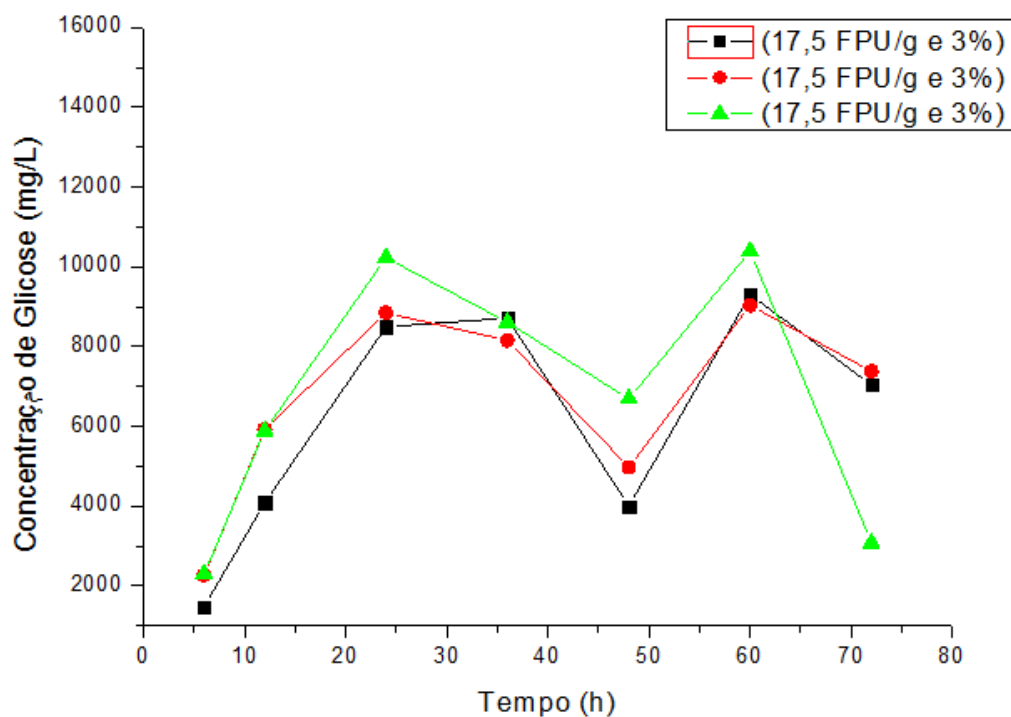
A partir da Figura 25, observa-se para as condições 1 e 2, onde a carga enzimática variou e se manteve constante a relação entre massa seca de bagaço por volume do meio reacional (condição de menor razão: 2 %) que não apresentaram um mesmo perfil cinético para o aumento da concentração de glicose. A condição 1 apresentou um perfil cinético mais suave devido as condições de carga enzimática e relação massa seca de bagaço por volume reacional serem mais brandas. Na condição 2 a qual estava na condição de maior carga enzimática, 25 FPU/g, obteve-se máxima glicose em 36 horas de hidrólise, quase o dobro com relação ao máximo de glicose obtido na condição 1 em 60 horas.

Analisando as condições 3 e 4, observa-se que ambas apresentaram aproximadamente o mesmo perfil com relação ao crescimento da concentração de glicose. Novamente a carga enzimática variou e se manteve constante a relação entre massa seca de bagaço por volume do meio reacional, neste caso a condição foi a de maior razão: 4 %. Observa-se também que ambos tiveram seu ponto máximo de glicose produzida em 36 horas de hidrólise.

Já comparando duas condições com a mesma carga enzimática, a exemplo das condições 2 e 4, e a relação massa seca de bagaço por volume meio reacional variando,

ambas apresentam o mesmo perfil, diferenciando na quantidade de glicose produzida que apresenta valores quase que dobrados quando se dobra a razão massa seca de bagaço por volume reacional.

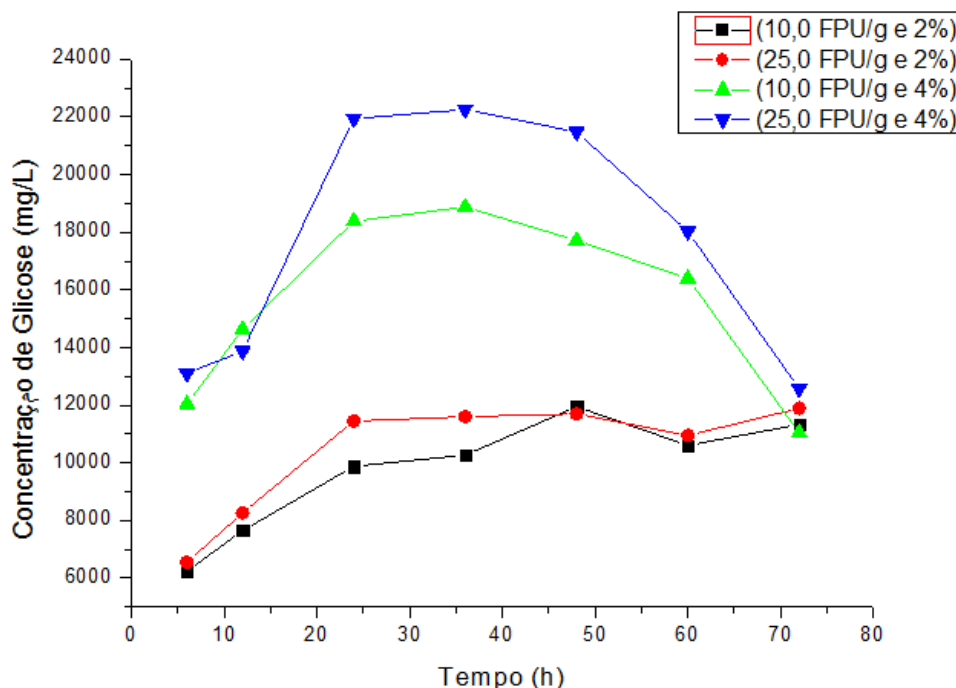
Figura 26 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola *in natura* para as condições 5, 6 e 7 (Pontos Centrais).



Observa-se na Figura 26 o mesmo perfil para os 3 pontos centrais. Os quais apresentaram máxima concentração de glicose em 24 horas de hidrólise.

Nas Figuras 27 e 28, estão apresentadas as cinéticas da hidrólise enzimática para o bagaço de acerola pré-tratado. Na Figura 27 as cinéticas para as condições 1, 2, 3, e 4 e na Figura 28 as cinéticas referente aos três pontos centrais (5, 6 e 7).

Figura 27 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola pré-tratado para as condições 1, 2, 3 e 4.

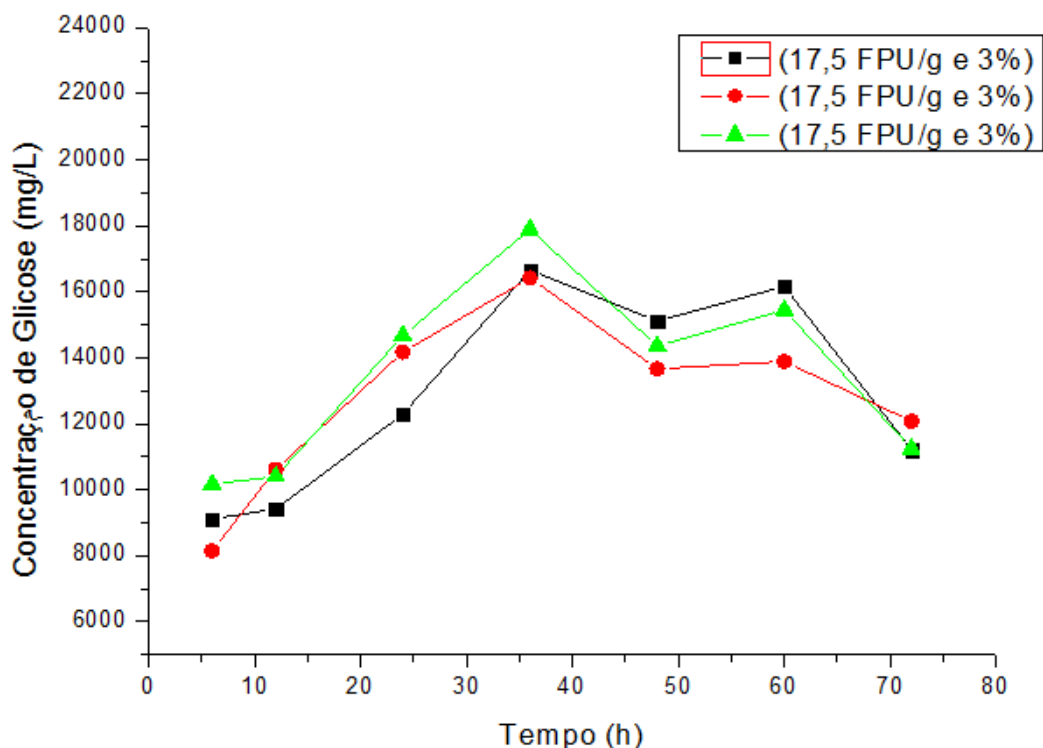


A partir da Figura 27, pode-se observar que para as condições 1 e 2, onde a carga enzimática variou e se manteve constante a relação entre massa seca de bagaço por volume do meio reacional (condição de menor razão: 2 %) ambos tiveram seu ponto máximo de glicose produzida em 48 horas. Embora que na segunda condição a qual estava a condição de maior carga enzimática, 25 FPU/g, observa-se um pico em 24 h de hidrólise mantendo-se praticamente constante até as 48 h.

Analisando as condições 3 e 4, observa-se que ambas tiveram o mesmo perfil com relação ao crescimento da concentração de glicose. Novamente a carga enzimática variou e se manteve constante a relação entre massa seca de bagaço por volume do meio reacional, neste caso a condição foi a de maior razão: 4 %. Observa-se também que a quarta condição (maior carga enzimática) apresentou um pico em 24 h, que permaneceu praticamente constante até as 48 h.

Já comparando duas condições com a mesma carga enzimática, a exemplo das condições 2 e 4, e a relação massa seca de bagaço por volume meio reacional variando, ambas apresentam o mesmo perfil, diferenciando na quantidade de glicose produzida que apresenta valores dobrados quando se dobra a razão massa seca de bagaço por volume reacional.

Figura 28 – Cinética da Hidrólise Enzimática do Bagaço de acerola pré-tratado para as condições 5, 6 e 7 (Pontos Centrais).



Observa-se na Figura 28 o mesmo perfil para os 3 pontos centrais. Os quais apresentaram máxima concentração de glicose em 36 horas de hidrólise.

Os rendimentos da hidrólise enzimática foram analisados a partir do percentual de aumento da glicose durante as 72 horas de hidrólise para cada condição (Tabela A3 e A4), com relação ao valor de glicose teórico. Esse valor teórico foi calculado a partir da razão entre a massa de glicose presente em 3 gramas do bagaço de acerola (*in natura* e pré-tratado) e o volume do meio reacional. Essa massa de glicose foi determinada a partir da quantidade de celulose presente no bagaço de acerola *in natura* (24,7 %) e pré-tratado (49,6 %) e sabendo que pela estequiometria da reação de produção de glicose a partir da celulose, tem-se que 1 grama de celulose produz 1,1 grama de glicose. O valor de glicose teórico para a hidrólise do bagaço de acerola *in natura* e pré-tratado encontram-se nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Concentração teórica de Glicose para o Bagaço de acerola *in natura*.

Experimento	Concentração de Glicose Teórica (g/L)
1	5,5
2	5,5
3	11,0
4	11,0
5	8,2
6	8,2
7	8,2

Tabela 12 – Concentração teórica de Glicose para o Bagaço de acerola pré-tratado.

Experimento	Concentração de Glicose Teórica (g/L)
1	11,0
2	11,0
3	22,0
4	22,0
5	16,5
6	16,5
7	16,5

Todas as condições trabalhadas apresentaram um rendimento máximo de 100 %, mas a melhor produção de glicose e melhor produtividade foi para a condição 4, que estava nas condições de maior carga enzimática e razão massa seca de bagaço por volume reacional, onde a produção de glicose foi de aproximadamente 22,3 mg/L de glicose em 36 horas de hidrólise.

4.4.1. Análise Estatística dos Dados Experimentais

O diagrama de Pareto é apresentado na Figura 29 para a melhor condição da hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* que foi em 36 horas. Pode-se afirmar que tanto a carga enzimática (FPU/g) como a relação massa seca do bagaço de acerola por volume reacional (%), influenciam o processo de maneira positiva, ou seja, aumentando a concentração de glicose. Já a interação entre essas duas variáveis também influencia, mas de maneira negativa. Os dados foram analisados em nível estatístico de 95% de confiança apresentando um coeficiente de determinação de 88 % (Tabela 13).

Figura 29 - Diagrama de Pareto para a Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola *in natura* em 36 horas.

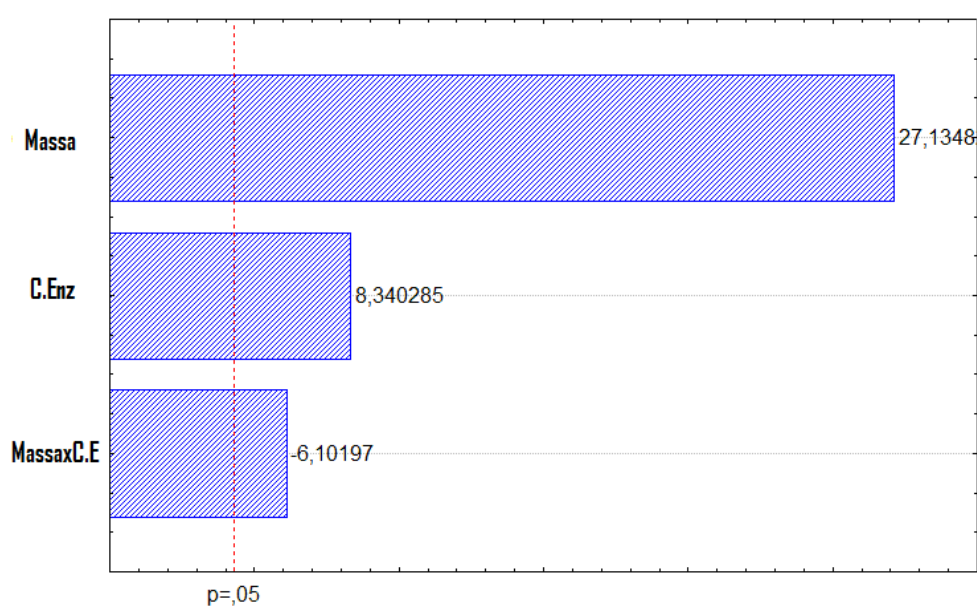


Tabela 13 - Análise de Variância (ANOVA) para Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola *in natura* em 36 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	75083747	2	37541873,5	2,11
Resíduo	10264259	4	2566064,75	
Total	85348006	6		
% R ²	88			

$F_{\text{tabelado}} = 6,94$ $F_{\text{calculado}} = 14,63$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = ($F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$).

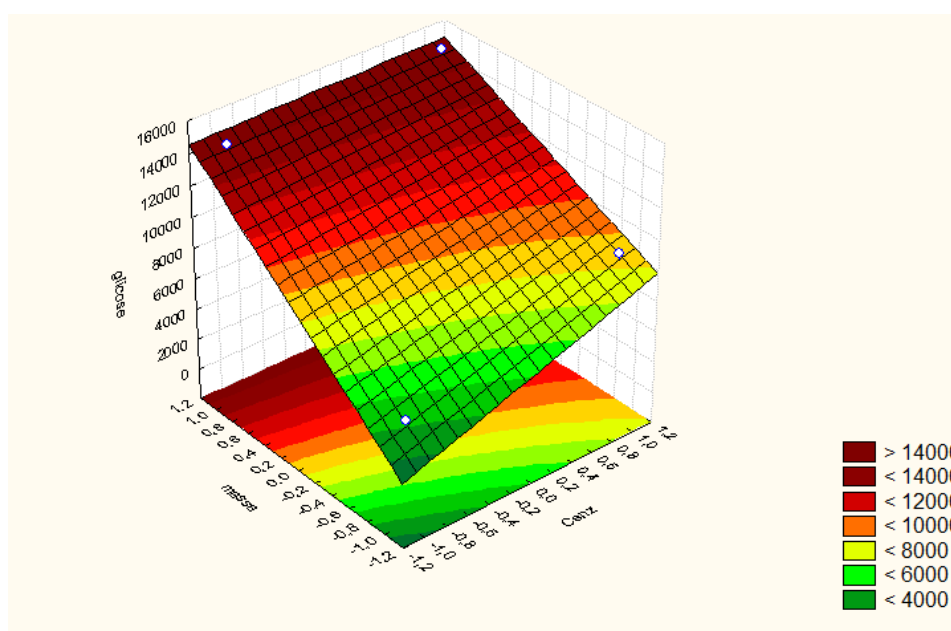
Segundo Box *et al.* (1978) para valores de F maior que 1,00 o modelo estatístico é considerado significativo e para valores de F maior que 4,00 o modelo é significativo e preditivo. Neste caso para a concentração de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* o modelo é significativo uma vez que o valor de F foi de 2,11.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a concentração de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* é apresentado na Equação 12.

$$\text{Conc. de Glicose (mg/L)} = 9881,793 + 4048,855\text{Massa} + 1244,475\text{C.Enz} - 910,490\text{Massa}\times\text{C.E} \quad (12)$$

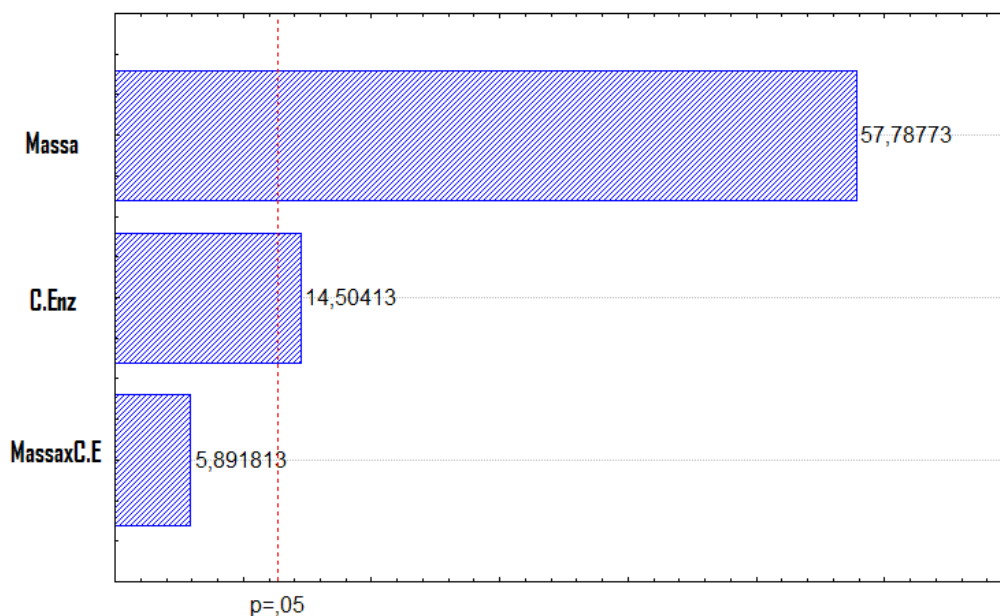
A Figura 30 apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura*. Observa-se que nos intervalos estudados a maior concentração de glicose ocorre para o nível mais alto da relação massa seca do bagaço de acerola por volume reacional e maior valor da carga enzimática.

Figura 30 - Superfície de resposta para produção de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola *in natura* no tempo de 36 horas.



Na Figura 31 é apresentado o Diagrama de Pareto para a melhor condição da hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado que foi em 36 horas.

Figura 31 - Diagrama de Pareto para a Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola pré-tratado em 36 horas.



Pode-se afirmar que tanto a carga enzimática (FPU/g) como a relação massa seca do bagaço de acerola por volume reacional (%), influenciam o processo de maneira positiva, ou seja, aumentando a concentração de glicose. Já a interação entre essas duas variáveis não influencia uma vez que não é significativa. Os dados foram analisados em nível estatístico de 95% de confiança apresentando um coeficiente de determinação de 99 % (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise de Variância (ANOVA) para Hidrólise Enzimática do bagaço de acerola pré-tratado em 36 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	98505993	3	32835331	4.12
Resíduo	8030459	2	415229.50	
Total	99309039	5		
% R²	99			

$$F_{\text{tabelado}} = 19,164 \quad F_{\text{calculado}} = 79,07$$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = (Fcalculado / Ftabelado).

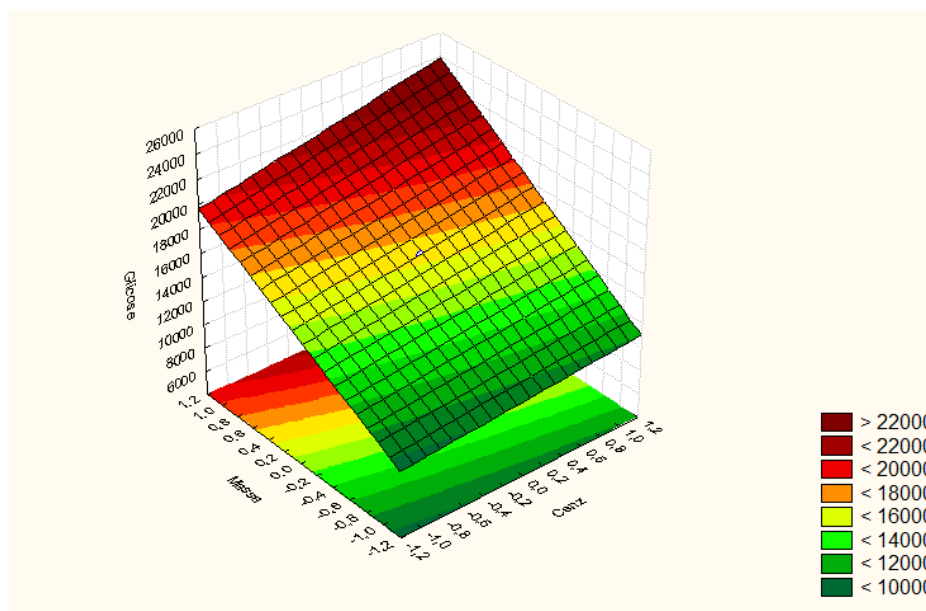
Neste caso para a concentração de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado o modelo é significativo e preditivo uma vez que o valor de F foi de 4,12.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a concentração de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado é apresentado na Equação 13.

$$\text{Conc. de Glicose (mg/L)} = 16031,37 + 4789,85\text{Massa} + 1202,21\text{C.Enz} \quad (13)$$

A Figura 32 apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de glicose obtido na hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado. Observa-se que nos intervalos estudados a maior concentração de glicose ocorre para níveis mais altos como a relação massa seca do bagaço de acerola por volume reacional e maiores valores da carga enzimática.

Figura 32 - Superfície de resposta para produção de glicose na hidrólise enzimática do bagaço de acerola pré-tratado no tempo de 36 horas.



5. CONCLUSÃO

A caracterização lignocelulósica do bagaço de acerola foi uma etapa muito importante e um dado essencial do trabalho sendo utilizada como parâmetro comparativo entre o bagaço *in natura* e a eficiência do pré-tratamento utilizado quanto à remoção de hemicelulose e lignina e conseqüentemente um aumento na glicose.

A caracterização microestrutural evidenciou a cristalinidade e a modificação na morfologia do bagaço de acerola após o pré-tratamento aplicado.

A redução no teor de extrativos, de 14,5% no bagaço *in natura* para 4,1% no bagaço pré-tratado, mostrou o quanto de biomassa é solubilizada na etapa do pré-tratamento.

A cinética de hidrólise para o bagaço *in natura* e pré-tratado mostrou rendimentos de 100% para todos os experimentos, cada um diferenciando em termos do tempo de máxima conversão e a concentração de glicose obtida.

O melhor valor obtido foi para a condição 4 na hidrólise do bagaço de acerola pré-tratado, no qual trabalhou-se com as maiores condições de carga enzimática e relação massa seca de bagaço por volume de meio reacional (25FPU/g e 4%) no tempo de 36 horas de hidrólise.

O bagaço de acerola apresenta-se como excelente matéria-prima para obtenção de etanol de segunda geração, devido ao seu alto teor de celulose e rendimento de hidrólise, como também por ser um resíduo lignocelulósico abundante e de baixo custo para obtenção de açúcares fermentescíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. B. CEPPA. v. 18, p. 57-70, 2000.

AGUIAR, T. M.; RODRIGUES, F. S.; SANTOS, E. R.; SABAA-SRUR, A. U. O. Caracterização química e avaliação do valor nutritivo de sementes de acerola. Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição. São Paulo, v. 35, n. 2, p. 91-102, 2010.

ALDRIGUE, M. L.; MADRUGA, M. S.; FIOREZE, R.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Aspecto da ciência e tecnologia de alimentos. João Pessoa: Ed. UFPB, v. 1, p. 98, 2002.

ALVIRA, P.; THOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based in enzymatic hydrolysis: Ariview. Bioresource Technology. v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. Energy, v. 31, p. 2447-2459, 2006.

ARO N, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptiond regulation of plant cell wall degration by filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

BASTOS, V. D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Sociol Setorial, Rio de Janeiro, n25, p. 5-38, 2007.

BAUDEL, H. M. Pré-Tratamento e Hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. São Paulo, 2006.

BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M. Análise preliminar da produção de etanol a partir da celulose. Espírito Santo do Pinhal: Engenharia Ambiental, 2009.

BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 163-170, 2005.

BETANCUR, G. V. J.; PEREIRA, N. J. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electron J Biotechnol*, 13:1-9, 2010.

BIANCHI, M. L. Polpação da palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv. Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

BISARIA, V.S. Bioprocessing of agro-residues to value added products. In: MARTIN, A.M. (Ed.). *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, second ed. Chapman and Hall, UK, 1998.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de açúcar. Piracicaba: USP, 2011.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters*. John Wiley e Sons, New York, p 653, 1978.

BRODEUR, G; YAU, E; BADAL, K; COLLIER, J; RAMACHANDRAN, K. B; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, Tallahassee, p.1-17, 2011.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. *The fungi*. 2.ed. London: Ed Elsevier Academic Press, p. 588, 2002.

CARVALHO, J. C. C.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E.J. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas á base de milho e farelo de soja suplementados com complexos enzimáticos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 292-298, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 1-12, 2010.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CHAHAL, D. S. Solid State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 49, p. 205-210, 1985.

CLAEYSSSENS, M; TOMME, P. Structure-activity relationships in cellulolytic enzymes. In: COUGHLAN, M. P. (Ed). *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. London: Elsevier, p. 37-49, 1989.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 29, p. 3-23, 2005.

COSTA, F. A.; ANDRADE, W. D. C. A. A Cultura da Acerola no Brasil e no Pará. Aspectos Estruturais de Produção e Mercado. Belém: ADS/AMAZÔNIA, 2003.

CUNHA, C. M.; SILVA, F. T. Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. 6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components. V. VII, p. 221-226, 2001.

D'ALMEIDA, M.L.O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: *Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica*, Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT-, 2^o Edição, v. 1, Cap. III, p. 45-106, 1988.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. *Methods in Lignin Chemistry*. New York. Springer Verlag, 1992.

DUFF, S.J.B., MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55 (1): p. 1-33, 1996.

FAN, L.T.; HHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. *Cellulose hydrolysis*. New York: Springer-Verlag, 1987.

FAO, 2010. Atualizado em 16/12/2009. Produtividade das culturas do mundo. Disponível em : < <http://faostat.fao.org/> >. Acessado em 25 de Agosto de 2010.

FENGEL, D.; WEGENER G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FREIRE, F.C.O. Doenças da acerola no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. e ALVES, E. Acerola no Brasil: Produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, p.71, 1995.

FREITAS C. A. S.; MAIA G. A.; COSTA J. M. C.; FIGUEIREDO R. W.; SOUSA P. H. M. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. Revista Brasileira de Agrociência. Pelotas, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. .; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. Journal of Food Engineering. V. 74, p. 78-88, 2006.

GHOSE, T.K. Measurement of Cellulase Activities. Pure & Applied Chemistry, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. Biotechnol Bioeng. 51, p. 375-383, 1996.

HAMENLICK, C.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. Biomass and Bioenergy, v. 28, p. 384-410, 2005.

HASSUANI, S.J. Resíduos agrícolas – palha. In: Curso Internacional: “Energia na Indústria de Açúcar e Álcool”, Piracicaba. São Paulo: CTC – Copersucar. Brasil, 2005.

HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. In: Biosynthesis and biodegradation of Wood Components. London: Academic Press Inc, p. 557-577, 1985.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. Chemical Technology. 10(5): 315-319, 1980.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: Handbook on bioethanol production and utilization. Wyman C. F. (Ed), Taylor e Francis, Bristol, p. 179-195, 1996.

HU, Z.N.; WEN, Z.Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.369-378, 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acessado em 03 de abril de 2009.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger*. *Research Journal of Biological Sciences*. v. 2, n. 1, p. 1316, 2007.

KUMAR, S., SINGH, S.P., MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: a review. *Chem. Eng. Technol.* 32 (4): 517-526, 2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J. ANTAL JR, M.; LYND, L. R. A. Comparison of Liquid Hot Water and Steam Pretreatments of Sugar cane bagasse for Bioconversion to Ethanol. *Bioresource Technology*, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEÃO, D. A. S.; CONCEICAO, M. M.; CONRADO, L. S; LIMA, C. S. S; SILVA, F. L. H; SILVA, A. S. Optimization of prehydrolysis and hydrolysis of bagasse sisal. In: ISAF: International Symposium on Alcohol Fuels. *Biotechnology for bio fuels*. Cidade do Cabo, v. 06. p. 109 -115, 2013.

LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology*. v. 56, p. 1-24. 1997.

LIMA, V.L.A.G; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D.E.S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpigia emarginata* D.C). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n.1, p. 101-103, 2003.

LORENCINE, P. Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de Hidrogênio. *Dissertação de Mestrado*, Ribeirão Preto, 2013.

LOUSADA JR, J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUES, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas

tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. Revista Ciência Agronômica, v.37, n.1, p.70-76, 2006.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. Biotechnology Progress. v. 15, p. 804-816, 1999.

MARINO NETTO, L. Acerola, a cereja tropical. São Paulo: Nobel, p. 94, 1986.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P.; Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, p. 292- 324, 1994.

MEZADRI, T.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLANO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. El fruto de la acerola: composición, características productivas e importância econômica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. V. 56, n. 2, 2006.

MIELENZ, J.R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Current Opinion Microbiology. v.4, p.324-329. 2001.

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

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. Documentos 236 – Procedimentos para Análise Lignocelulósica. Embrapa Algodão – Campina Grande/PB. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP). ISSN 0103-0205, 1ª ed., v. 1, pg. 10-52, 2010.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. Revista Árvore, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MUSSATTO, I.S. Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Brasil. 2002.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. African Journal of Biotechnology. v. 5, n. 20, p.1873-1881, 2006.

NASCIMENTO, V. M. Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. São Carlos: UFSCar, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. Química Nova, v. 36, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. Biresource Technology, V. 28, p. 2503-2510, 2006.

OJUMU, T. V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. African Journal of Biotechnology. v. 2, n. 6, p. 150–152, 2003.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. Enzyme Microbial Technology, v. 18, p. 312 – 331. 1996.

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. Journal of Biotechnology, v. 7, p. 65-72, 2004.

PARISI, F. Advances in Lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. Adv. Biochemistry Eng, v. 38, p. 53-87, 1989.

PEREIRA JR., N.; SCHLITTLER, L. A. F. S.; Produção de Etanol a partir de Biomassa Lignocelulósicos: Pré-tratamentos e Estratégias de Processamento. Diálogos e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC. Ano II, n. 6, 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.

PRADO, A. G.; MENEZES, R. S. C.; ABREU, C. A. M.; Quantificação dos extrativos, celulose e lignina da palma miúda (*Nopalea cochenillifera*). X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, Universidade Federal Rural de Pernambuco –UFRPE, Recife, out. 2010.

RABELO S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Campinas: Tese de Doutorado da Faculdade de Engenharia Química, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of ligocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, 4: 54, 2011.

RODRIGUES, T. H. S. Estudo do pré-tratamento alcalino em microondas da fibra do caju (*Anacardium occidentale* L.) seguido de hidrólise Enzimática para produção de etanol. Fortaleza: UFC, 2010.

SAHA, B. C., Hemicellulose Bioconversion, *J. Int. Microbiol Biotechnol*, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, s. t. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, K. O.; NETO, B. A. M.; OLIVEIRA, S.; RAMOS, M. E. C.; AZEVEDO, L. C. Obtenção de farinha com o resíduo da acerola (*Malpighia Glabra* L.). Congresso de Pesquisa e Inovação da rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, Índia, p.19-27, 2012.

SEBRAE, 2009. Disponível em: <http://www.abanorte.com.br/noticias/noticias-principal/brasil-e-o-terceiro-maior-produtor-de-frutas-do-mundo/> acessado em 09 de novembro de 2012.

SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; MIRANDA, R. C. M.; NARAIN, N. Utilização de Resíduo Agroindustrial como Matéria-Prima Para a Produção de Ácido Cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. Scientia Plena, vol. 8, n. 5, 2012.

SILVA, O. G. Produção de Etanol com Utilização do Bagaço de Cana-de-açúcar. Faculdade Tecnológica de Araçatuba, 2010.

SIQUEIRA, G. A. F. Preparation of ethylenediamine-anchored cellulose and determination of thermochemical data for the interaction between cations and basic centers at the solid/liquid interface. Carbohydrate Research, Amsterdam, v. 341, n. 17, p. 2842-2850, 2006.

SINGH, S.; MADLALA, A.M.; PRIOR, B.A. Thermomyces lanuginosus: Properties of strains and their hemicellulases. FEMS Microbiology Reviews, v. 27, p. 3-16, 2003.

SOCOL, C. R; PRADO, F. C; VANDENBERGHE, L. P. S; PANDEY, A. General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, p. 652-664, 2003.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polymer Degradation and Stability, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.

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

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. Int. J. Mol. Sci., 9: 1621-1651, 2008.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical principles of textile conservation. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heimann, 1998.

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

VASCONCELOS, V.R.; NEIVA, J.N.M.; PIMENTEL, J.C.M. Utilização de subprodutos do processamento de frutas na alimentação de caprinos e ovinos. In: Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE, Fortaleza: FAEC, p. 83-99, 2002.

VIEIRA, P. A.F.; QUEIROZ, J. H.; VIEIRA, B. C.; MENDES, F. Q.; BARBOSA, A. A.; MULLER, E. S.; SANT'ANA, R. C. O.; MORAIS, G. H. K. Caracterização química do resíduo do processamento agroindustrial da manga (*Mangifera Indica* L.) Var. Ubá. *Alimentos e Nutrição, Araraquara*, v. 20, n. 4, p. 617-623, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Factors Influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*, 34: 3313 – 23, 2009.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T.; TONZAR, A. C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J. G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v 83, pg 950. 2008.

APÊNDICE

Tabela A1 - Condições da Hidrólise Enzimática para o bagaço de acerola *in natura*.

Condições	Massa de acerola (g)	Volume de extrato (mL)	Volume total (mL)	Volume do tampão (mL)	Tetraciclina (mL)
1	3,00	2,96	150,00	147,04	0,6
2	3,00	7,40	150,00	142,60	0,6
3	3,00	2,96	75,00	72,04	0,3
4	3,00	7,40	75,00	67,60	0,3
5	3,00	5,18	100,00	94,82	0,4
6	3,00	5,18	100,00	94,82	0,4
7	3,00	5,18	100,00	94,82	0,4

Tabela A2 - Condições da Hidrólise Enzimática para o bagaço de acerola pré-tratado.

Condições	Massa de acerola (g)	Volume de extrato (mL)	Volume total (mL)	Volume do tampão (mL)	Tetraciclina (mL)
1	3,00	4,75	150,00	145,25	0,6
2	3,00	11,89	150,00	138,11	0,6
3	3,00	4,75	75,00	70,25	0,3
4	3,00	11,89	75,00	63,11	0,3
5	3,00	8,32	100,00	91,68	0,4
6	3,00	8,32	100,00	91,68	0,4
7	3,00	8,32	100,00	91,68	0,4

Tabela A3 – Crescimento da Concentração de Glicose (mg/L) durante as 72h de Hidrólise Enzimática para o Bagaço de acerola *in natura*.

Tempo (h)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5	Condição 6	Condição 7
6	1689,98	1799,84	2485,83	2140,86	1482,82	2272,84	2300,27
12	3094,98	6067,83	6081,66	8930,2	4090,61	5930,35	5889,34
24	4054,02	7227	7537,36	10786,33	8494,56	8848,9	10234,61
36	4717,52	9027,45	14636,21	15304,18	8718,13	8156,58	8612,48
48	5785	5460,95	7210,48	8261,88	3999,63	4972,69	6690,77
60	6498,14	7790,65	8859,75	12348,37	9309,73	9034,35	10394,7
72	6262,89	6759,23	8479,33	6719,66	7040,4	7384,4	3083,28

Tabela A4 – Crescimento da Concentração de Glicose (mg/L) durante as 72h de Hidrólise Enzimática para o Bagaço de acerola pré-tratado.

Tempo (h)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5	Condição 6	Condição 7
6	6239,71	6549,12	12046,94	13105,18	9118,03	8150,9	10174,18
12	7652,57	8265,26	14631,46	13877,21	9420,44	10617,33	10401,08
24	9880,84	11453,39	18385,73	21939,93	12288,56	14171,46	14671,67
36	10273,44	11603,26	18876,44	22257,56	16657,04	16422,6	17894,69
48	11945,89	11701,14	17715,14	21476,57	15112,77	13665,18	14360,31
60	10608,25	10948,63	16399,27	18027,79	16162,69	13885,36	15449,77
72	11333,96	11891,05	11050,99	12572,4	11211,34	12080,33	11244,02