

# REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

## PRODUÇÃO DE ETANOL ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart)<sup>1</sup>

MÁRCIO DE ANDRADE CORDEIRO<sup>2</sup>, OSSALIN DE ALMEIDA<sup>3</sup>, ELIZABETH MARIA  
SOARES RODRIGUES<sup>3</sup>, ANTÔNIO MAIA DE JESUS CHAVES NETO<sup>4</sup> & NÉLIO  
TEIXEIRA MACHADO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Publicado no Ano de 2019;

<sup>2</sup>Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, mandradebio@yahoo.com.br;

<sup>3</sup>Faculdade de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará

<sup>4</sup>Faculdade de Física, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará

<sup>5</sup>Faculdade de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará

### RESUMO

O aproveitamento do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart), com fins energéticos tem sido pouco estudado, por tanto buscou-se nesse artigo estudar a produção de etanol de segunda geração a partir da hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* e tratado com solvente em duas condições de temperaturas (60 e 70 °C). Como resultados do processo de hidrólise enzimática, o caroço de açaí sem tratamento na temperatura de 60 °C (CANT60) mostrou ser uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol, por conter um alto teor de celulose (40,29%), além de apresentar bons rendimentos na liberação de glicose (13,687 g.L<sup>-1</sup>) após a hidrólise enzimática. No tratamento com solvente do caroço de açaí (CAT), na conversão de celulose em glicose, o rendimento ficou abaixo de 25%, nas duas condições de temperaturas (60 e 70 °C), não foi capaz de desestruturar a parede vegetal da biomassa, em especial, celulose, hemicelulose e lignina. Mediante a análise dos dados experimentais, podemos dizer que a

melhor condição da hidrólise enzimática do caroço de açaí foi o CANT60 com rendimentos de 84,54% em relação a concentração inicial de celulose e de 34,08% em relação a concentração inicial da polpa do caroço de açaí (40 g.L<sup>-1</sup>). A glicose obtida pela hidrólise enzimática do caroço de açaí foi bem assimilada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol, o rendimento, correspondeu a 87,08% em relação a concentração inicial de glicose (13,68 g.L<sup>-1</sup>).

**Palavras-chave:** Bioconversão, Biomassa, Biocombustível.

## **ETHANOL PRODUCTION THROUGH ENZYMATIC HYDROLYSIS OF AÇAÍ SEED (*Euterpe oleracea* Mart)**

### **ABSTRACT**

The use of açaí seed (*Euterpe oleracea* Mart), for energy purposes has been little studied, therefore it was sought in this article to study the production of second generation ethanol from the enzymatic hydrolysis of the açaí kernel *in natura* and treated with solvent under two temperature conditions (60 and 70 °C). As a result of the enzymatic hydrolysis process, the untreated açaí seed at the temperature of 60 ° C (CANT60) showed to be a promising lignocellulosic biomass to obtain ethanol, because it contains a high content of cellulose (40.29%), besides (13.687 g.L<sup>-1</sup>) after enzymatic hydrolysis. In the treatment with açaí kernel solvent (CAT), in the conversion of cellulose to glucose, the yield was below 25%, under both temperature conditions (60 and 70 °C), it was not able to de structure the biomass vegetal wall, in particular cellulose, hemicellulose and lignin. By analyzing the experimental data, we can say that the best condition of the enzymatic hydrolysis of the açaí seed was CANT60 with yields of 84.54% in relation to the initial concentration of cellulose and of 34.08% in relation to the initial concentration of the pulp of açaí seed (40 g.L<sup>-1</sup>). The glucose obtained by the enzymatic hydrolysis of the açaí seed was well assimilated by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the

ethanol production. The yield corresponded to 87.08% in relation to the initial glucose concentration (13.68 g.L<sup>-1</sup>).

**Keywords:** Bioconversion, Biomass, biofuel.

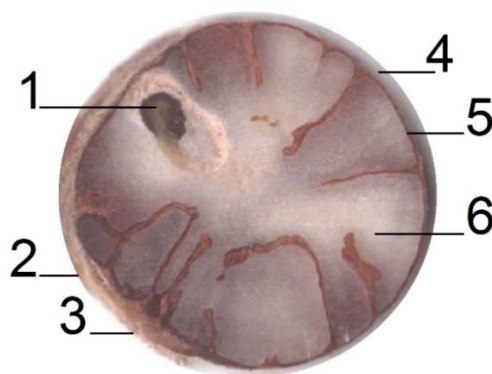
## 1. INTRODUÇÃO

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

O estado do Pará é o maior produtor nacional de açaí, no ano de 2016, a produção foi de 131.836 mil toneladas (61,2%), seguido do estado do Amazonas com 57.572 mil toneladas (26,7%) (IBGE, 2017). Da produção total (215.609 mil toneladas), 83% é resíduo (caroço). Atualmente, na região metropolitana de Belém são estimados cerca de dez mil pontos de venda da polpa de açaí, que em média, são produzidos por ponto de venda 200 kg/dia de resíduos, com um volume diário em torno de 1,6 a 2 t/dia, podendo chegar a 550.000 t/ano (SEDEME, 2017).

O caroço é uma semente oleaginosa, formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento, que na maturidade é rico em celulose (53,20%), hemicelulose (12,26%) e lignina (22,30%) (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008) e que mesmo após a remoção da polpa ainda apresenta elevados teores de celulose e hemicelulose (ALTMAN, 1956). Na Figura 1, é apresentada a anatomia do fruto do açaizeiro (CORDEIRO, 2016).

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



O caroço de açaí tem sido uma fonte de estudos ao interesse no desenvolvimento de tratamentos adequados para descarte e reutilização deste resíduo. Em estudo realizado por Townsend *et al.* (2001) que utilizou o caroço de açaí como ração animal para ruminantes, os resultados não foram satisfatórios, devido ao baixo valor nutricional e ao sabor adstringente causado pela presença de polifenóis.

O caroço de açaí e a capa do palmito foram utilizados por Teixeira *et al.* (2005) no processo de compostagem do solo, através de combinações com outros substratos. As fibras do caroço de açaí têm sido utilizadas como adição em compósitos aumentando a resistência mecânica e termomecânicas de poliofelinas (plásticos) recicladas (ITO *et al.*, 2007).

Outra aplicação para o resíduo de açaí é a utilização como substrato para a produção de enzimas por fermentação da lignocelulose, cujo principal interesse é a utilização dessa biomassa para a produção de biocombustíveis (ZUNIGA *et al.*, 2008).

O resíduo, caroço de açaí, é um enorme inconveniente ao bem-estar e higiene sanitária das cidades no norte do Brasil, onde são descartados em terrenos a céu aberto e que nos últimos anos tem se mostrado como um resíduo de processamento com poucas alternativas tecnológicas para seu aproveitamento (SILVA e ROCHA, 2003). Objetivou-se com este estudo, avaliar o processo de hidrólise enzimática do caroço de açaí utilizando a mistura comercial  $\beta$ -glucosidase, também conhecida como celobiase (NS22118, Cellulosic Ethanol Enzyme Kit) para a produção de etanol.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## **2.1. MATERIAIS**

### **2.1.1. Enzima**

A enzima utilizada neste estudo correspondeu a preparação comercial  $\beta$ -glucosidase, também conhecida como celobiase (NS22118, Cellulosic Ethanol Enzyme Kit), cedida pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca), fornecida pela Novozymes Latin America (Araucária-PR, Brasil).

### **2.1.2. Matéria-Prima**

As amostras do caroço de açaí (CA) *in natura* foram obtidas em pontos de vendas localizados em feiras livres de Belém-PA (1°28'28.77"S e 48°28'19.22"W). A coleta foi realizada logo após o despulpamento dos frutos para obtenção da polpa (suco) do açaí.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Tratamento do Caroço de Açaí (CA)**

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

### **2.2.2. Moagem e Distribuição do Tamanho da Partícula**

O CA seco (6,0 kg) foi triturado em moinho de facas (WILLEY, Modelo WLS-3004) e acondicionado. A distribuição granulométrica foi realizada em um agitador magnético de peneiras (BERTEL, Modelo 1868), durante 30 minutos com agitação de 15 rpm, tendo sido utilizadas peneiras da série padrão Tyler de 8, 10, 14, 28 e 48 mesh (MENTOR, Modelo RX-29-10).

O diâmetro médio da partícula foi determinado de acordo com a metodologia do diâmetro médio de Sauter (FIORI et al., 2008), conforme a Equação 1. Para todas as extrações, foram utilizadas partículas de 24 mesh (0,71 mm).

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n (m_i \cdot d_i^3)}{\sum_{i=1}^n (m_i \cdot d_i^2)} \quad (1)$$

Onde,  $d_m$  é o diâmetro médio (mm),  $m_i$  é a massa retida na  $i$ -ésima peneira (g) e  $d_i$  é a abertura nominal da  $i$ -ésima peneira (mm).

A determinação do diâmetro médio geométrico da partícula foi feita conforme a Equação 2 (ASAE Standards, 1998).

$$d_g = \log^{-1} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (W_i \cdot \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n W_i} \right] \quad (2)$$

Onde,  $\bar{d}_i$  ( $\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$ ) é a abertura nominal da  $i$ -ésima peneira (mm);  $d_{i+1}$  é a abertura nominal da peneira maior que a  $i$ -ésima peneira (mm);  $W_i$  é a massa do material retido na  $i$ -ésima peneira.

### 2.2.3. Extração do Corante do CA

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

O solvente de cada extração foi removido em evaporador rotativo (HEIDOLPH, Laborota 4000), a pressão reduzida na temperatura de 50 °C até, aproximadamente, 1/5 do seu volume. Os extratos hexânico (CAH) e etanoico (CAEtOH) foram transferidos para frascos de vidro âmbar e armazenado em freezer doméstico (Cooler H-300 Eletrolux) a -10 °C. Os rendimentos dos extratos foram calculados pela razão entre a massa de extrato seco em relação à massa da amostra seca.

#### **2.2.4. Caracterização do CA**

##### **a. Umidade**

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

##### **b. Voláteis**

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

##### **c. Cinzas**

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

##### **d. Carbono Fixo**

A determinação de carbono fixo foi realizada de acordo com método ASTM D6316-09b (2009). O teor de carbono fixo é uma medida indireta, sendo calculado de acordo com a Equação 3.

#### e. Lipídeos

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

#### f. Proteínas bruta (Método de Kjeldahl)

O teor de proteína foi determinado de acordo com o método 991.20 da AOAC (2002), as amostras foram submetidas a digestão com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado até o ponto de ebulição em bloco digestor (TECNAL, Modelo, TE-1001, Brasil). Em uma segunda etapa, o material digerido foi destilado em destilador de nitrogênio (MARCONI, MA-036). O nitrogênio total (N<sub>T</sub>) foi calculado de acordo com a Equação 4.

$$N_T = \frac{(V_a - V_b) \cdot F \cdot 0,1 \cdot 0,014 \cdot 10}{M_1} \quad (4)$$

Onde,  $N_T$  é o teor de nitrogênio total na amostra (%);  $V_a$  e  $V_b$  são os volumes (mL) da solução de ácido clorídrico gastos na titulação da amostra e do branco, respectivamente;  $F$  é o fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol.L<sup>-1</sup> e  $M_1$  é a massa da amostra (g). O cálculo da proteína bruta (P<sub>B</sub>) foi realizado de acordo com a Equação 5.

$$P_B = N_T \cdot F_N \quad (5)$$



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

#### **g. Fibras**

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

#### **h. Celulose e Hemicelulose**

A determinação de celulose e hemicelulose foi adaptada de acordo com a metodologia descrita por Updegraff, 1969. Para a determinação dos teores de celulose e hemiceluloses foi necessário extrair a holocelulose (celulose + polioses) da amostra. Para a extração da holocelulose, foram transferidos para um béquer (250 mL), 5,0 g do CA (seco e moído) livre de extrativos, contendo 60 mL de água destilada, 10 mL de hipoclorito de sódio (6%) e 7 mL de ácido acético glacial. O sistema foi aquecimento em banho-maria ( $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), durante 60 minutos, com agitação constante.

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

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

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

**i. Lignina Insolúvel (Klason - TAPPI, 1999)**

Em um Erlenmeyer (250 mL) contendo 5,0 g do CA (seco e moído), foram transferidos 50 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m). A mistura foi submetida a agitação constante em um agitador magnético (FISATOM, Modelo 752A) durante 24 h em temperatura ambiente ( $T \approx 28,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Após esse período, a mistura foi transferida para um balão de destilação (1000 mL), contendo 500 mL de água destilada e aquecido sob refluxo ( $T \approx 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 5 horas. A lignina insolúvel foi separada por filtração a vácuo em cadinho de placa sinterizada (n° 4), previamente tarado. Depois de lavado com água destilada (5 x 100 mL,  $T \approx 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ), o resíduo foi seco em estufa (FABBE, Modelo 119, São Paulo/SP) a  $105 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , até peso constante. O teor de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$Lignina [\%] = \left( \left( \frac{M_2}{M_1} \right) \cdot 100 \right) - cinzas \quad (6)$$

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

**j. Potencial Hidrogeniônico (pH)**

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

**2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV/EDS)**

A análise das amostras (caroço e fibras do caroço de açaí *in natura*) foram em um Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada (HITACHI, TM 3000), operando a 15 kV com sistema acoplado para análise química semi-quantitativa por EDS (*Espectroscopia de Energia Dispersiva*), com software para análise *line scan* (análise química ao longo de uma linha dentro de uma região selecionada), operando sempre no modo elétrons retro espalhados (BSE – *backscattered secondary electrons*).

### 2.2.6. Determinação da Atividade Enzimática

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

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

A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a  $50 \pm 2$  °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 3 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), posteriormente, os tubos foram colocados em banho maria até ebulição ( $T \approx 100$  °C) durante 5 minutos, depois foram adicionados 20 mL de água destilada, em seguida, os tubos foram levemente agitados para a completa homogeneização da mistura.

Para a prova em branco o complexo enzimático foi substituído pela solução tampão acetato de sódio (5 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicata. Para o cálculo da atividade enzimática, foram considerados a quantidade absoluta de glicose de 2,0 mg (Equação 7).

$$2,0 \text{ mg glicose} = \frac{2,0}{0,18016 \mu\text{mol}} \quad (7)$$

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

$$2,0 \text{ mg glicose} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})} \quad (8)$$

$$2,0 \text{ mg glicose} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ (UI} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} \quad (9)$$

$$\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{0,37}{\text{Conc. de enzima referente a 2,0 mg glicose}} \text{ (UI} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} \quad (10)$$

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

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

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

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

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} = \left( \frac{\text{Volume da enzima na diluição}}{\text{Volume total de diluição}} \right) \quad (11)$$

Com o valor da concentração de enzima conhecida, foram calculadas as unidades de acordo com a Equação 12.

$$\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{2,0}{0,18016 \cdot V_C \cdot t \cdot [\text{Enzima diluída}]} \quad (12)$$

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

### 2.2.7. Açúcares redutores totais (ART)

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

### **2.2.8. Hidrólise Enzimática do Carço de Açaí**

Estes ensaios, objetivaram, avaliar a melhor condição de pré-tratamento do CA (Item 2.2.3), usado no processo de hidrólise enzimática com massa reduzida. Foram realizados doze ensaios, divididos em quatro condições experimentais: CANT60 e CAT60 (T = 60 °C); CANT70 e CAT70 (T = 70 °C). A concentração inicial da polpa do CA correspondeu a 40 g.L<sup>-1</sup>. A carga enzimática (total) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato (m/m).

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

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

As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no Item 2.2.7 Em paralelo, foi realizada a prova em branco para cada ensaio, substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (25 mL, pH = 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

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

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

Os frascos foram submetidos a incubação em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) nas temperaturas de  $60 \pm 2$  °C e de  $70 \pm 1$  °C, com agitação periódica, foram realizadas coletas de nos tempos de 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas. Os hidrolisados foram submetidos a inativação enzimática em banho maria ( $T \approx 90$  °C) durante 1 hora, após este período, a mistura foi filtrada em cadinho de placa sinterizada (n° 1). As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no Item 2.2.7.

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

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

$$\text{Celulose } (\text{g.L}^{-1}) = \frac{m_{\text{Amostra}}(\text{g}) \times \text{Teor de Celulose } (\%)}{V_{\text{Hidrolisado}}(\text{L})} \quad (13)$$

### 2.2.9. Fermentação Alcolólica

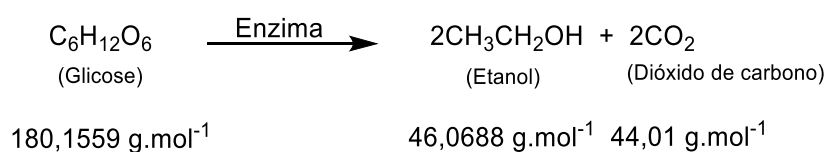
A fermentação alcoólica foi realizada em balão de vidro (fundo redondo) de 250 mL, contendo, 200 mL do hidrolisado com o pH ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico 1:1 (v/v), a inoculação do mosto foi feita com a adição de 2 g de fermento comercial seco instantâneo (*Saccharomyces cerevisiae*, FLEISCHMANN),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

A mistura foi submetida à incubação em agitador magnético (FISATOM, modelo 52M) a  $33 \pm 1$  °C, com agitação constante de 120 rpm, durante 24 horas. As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no item 2.2.7. O etanol produzido foi obtido por destilação simples. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

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



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



Para cada 180,1559 kg de glicose, são produzidos 92,1376 kg de etanol, ou seja, cada quilograma de glicose corresponde a 511,4326 kg de etanol. A massa de etanol dividido pela massa específica do etanol ( $789,23 \text{ kg.m}^{-3}$ ) resulta em 0,648014 L de etanol por kg de glicose.

Esse resultado é denominado "rendimento estequiométrico da fermentação", ou seja, o volume em litros de etanol que pode ser produzido por quilograma de glicose.

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

O rendimento da fermentação ( $Rf$ ), a produtividade ( $Qp$ ) e quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido ( $Y_{P/S}$ ), foram calculados pelas Equações 14, 15 e 16.

$$Rf[\%] = \frac{C_{(EtOH)Exp}}{C_{(EtOH)Teo}} \cdot 100 \quad (14)$$

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

$$Qp [g.L^{-1}.h^{-1}] = \frac{C_{(EtOH)Exp}}{t} \quad (15)$$

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

$$Y_{P/S} [g.L^{-1}] = \frac{C_{(EtOH)Final} - C_{(EtOH)Inicial}}{C_{(Glicose)Inicial} - C_{(Glicose)Final}} \quad (16)$$

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

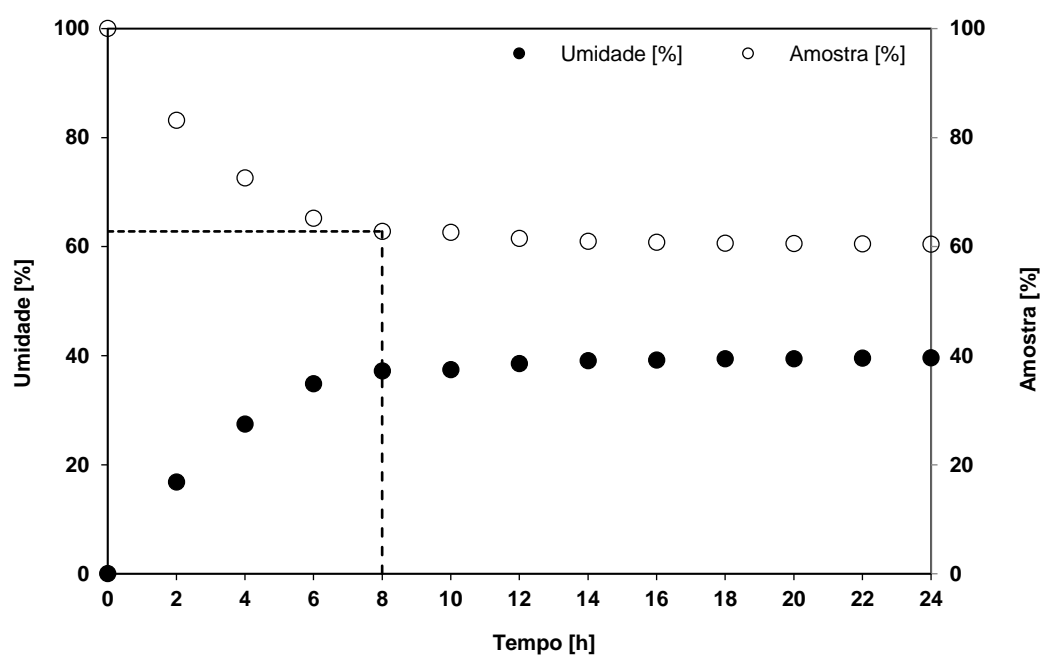
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Tratamento do Carço de Açáí



O teor de umidade e o rendimento em base úmida do caroço de açaí *in natura* foi de 39,59 e 60,41%, respectivamente. De acordo com o perfil da curva de secagem do caroço de açaí (Figura 3), indica que a secagem ocorreu nas primeiras 8 horas, correspondendo ao primeiro período da taxa decrescente. Isto sugere que o caroço de açaí apresenta em sua estrutura externa uma maior concentração de água.

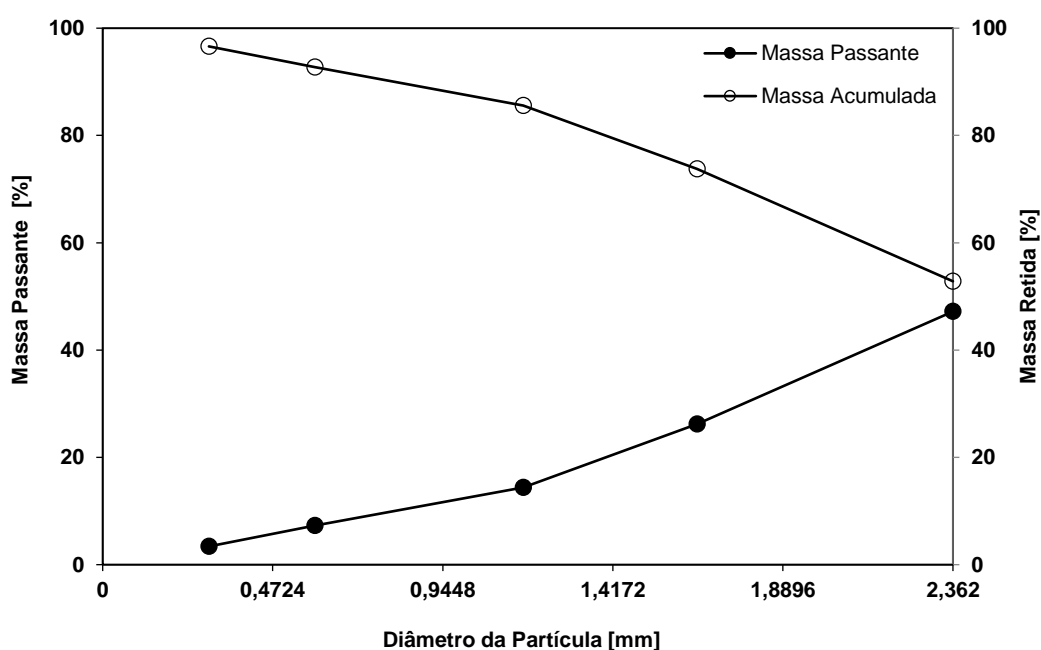
**Figura 3.** Curva de secagem do caroço de açaí ( $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_{\text{ar}} = 0,5\text{ m.s}^{-1}$ ).



Na Figura 4, é apresentada a curva granulométrica do caroço de açaí, a fração média do caroço de açaí não peneirado foi de 52,82%, correspondente a um diâmetro de 2,362 mm. Neste estudo, foram utilizadas partículas de diâmetro 48 mesh (0,295 mm), o rendimento médio

foi de 3,40%. O processo de moagem foi repetido até que fosse obtida uma quantidade de substrato suficiente para a realização dos experimentos.

**Figura 4.** Curva granulométrica do caroço de açaí.



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

### 3.2. Caracterização do Caroço de Açaí

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da caracterização do caroço de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT).

**Tabela 1.** Composição média do caroço de açaí (g/100 g em base seca).

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

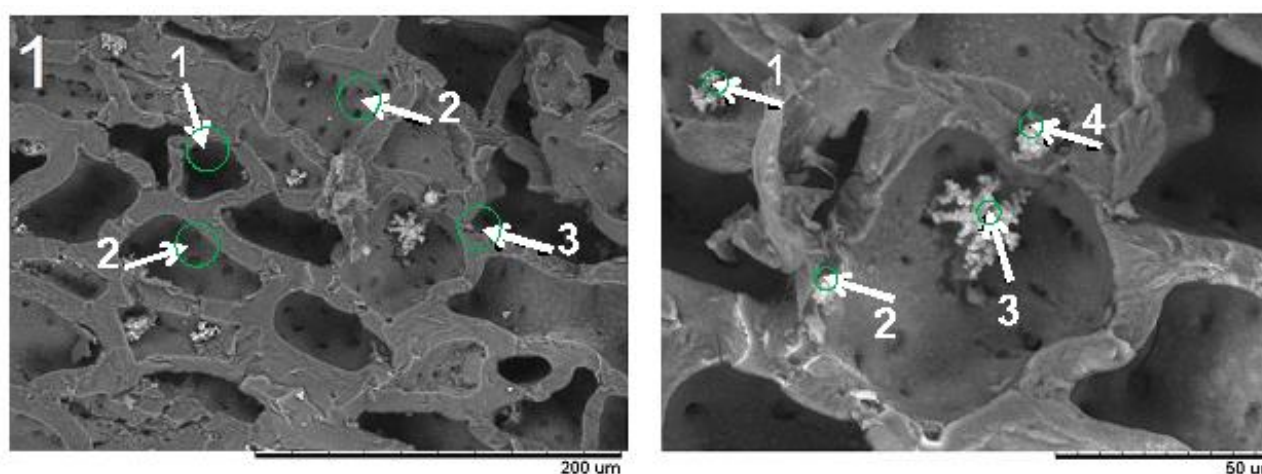
Para o CANT e CAT, os balanços de massas não totalizaram 100%, dados citados na literatura também mostram fato semelhante para o bagaço de cana-de-açúcar (91%), palha de trigo (95%), sabugo de milho (95%) e grama (88,4%) (PANDEY et al., 2000; SUN & CHENG, 2002).

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

### 3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura/ Microscopia de Energia Dispersiva de Raios X (MEV/EDS)

Na Figura 5, é apresentada a micrografia do caroço do açaí *in natura* (corte transversal). A micrografia 1, apresenta uma estrutura aberta com espaços vazios (1), pontuações (2) e fibras (3) unidas pela presença de hemicelulose e lignina. Na micrografia 2 (ampliação), é possível observar a presença de cristais sílica na forma de roseta (Pontos 1, 2, 3 e 4).

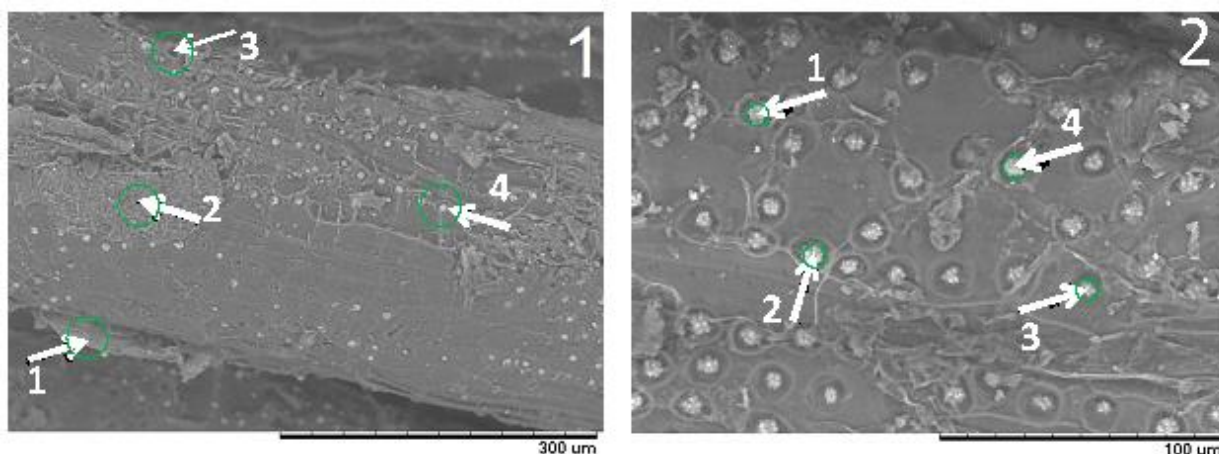
**Figura 5.** Micrografias do corte transversal caroço de açaí (mesocarpo). Ampliação de 500x (1) e ampliação de 1,2k (2).



F

Na Figura 6, é apresentada a micrografia das fibras caroço do açaí *in natura*. A micrografia 1, apresenta uma estrutura cilíndrica compacta, flocos de medula (1), cutícula (2), pontuações (3) e cristais de sílica (4) dispostos aleatoriamente. Na micrografia 2 (ampliação), é possível observar a presença de cristais sílica dentro das cavidades globulares (Pontos 1, 2, 3 e 4).

**Figura 6.-** Micrografias do perfil longitudinal fibra do caroço de açaí. Ampliação de 300x (1) e ampliação de 1,2k (2).



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

**Tabela 2.** Análise química semi-quantitativa do mesocarpo do caroço de açaí *in natura* (corte transversal).

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

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

**Tabela 3.** Análise química semi-quantitativa da fibra do caroço de açaí *in natura* (corte longitudinal).

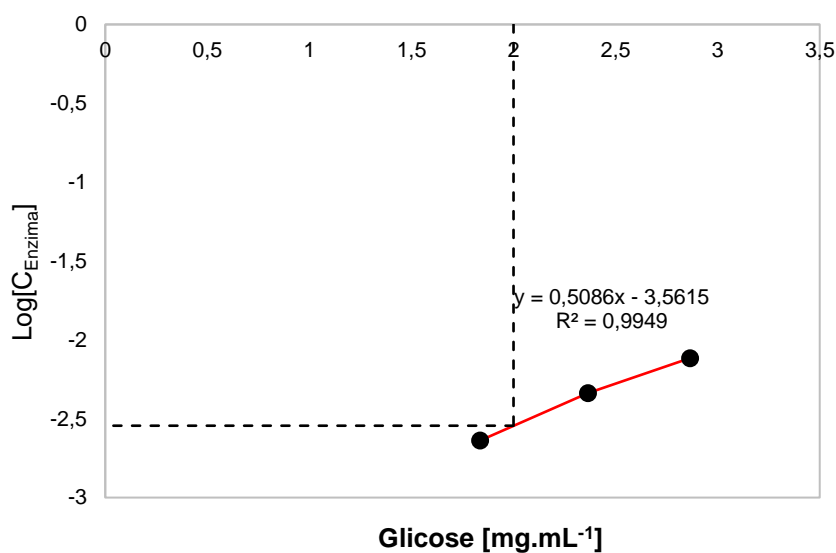
Ponto	C [%]	O [%]	Si [%]	Al [%]	Total
-------	-------	-------	--------	--------	-------

1	52,025	39,451	0,854	7,67	100
2	60,486	36,964	2,55	---	100
3	54,113	37,517	1,955	6,415	100
4	56,554	43,446	---	---	100

### 3.4. Atividade Enzimática Total

Para determinar a atividade do complexo enzimático, foram realizadas três diluições em solução de citrato de sódio 50 mM (pH = 4,8): 1:500, 1:250 e 1:100, correspondendo as concentrações iniciais de enzimas de 0,0023, 0,0046 e 0,0077 (v/v). Com os dados obtidos, construiu-se um gráfico (Figura 6) onde se relaciona a concentração de enzima em função da massa de glicose liberada.

**Figura 6.** Atividade enzimática (método das diluições).



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

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

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

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

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

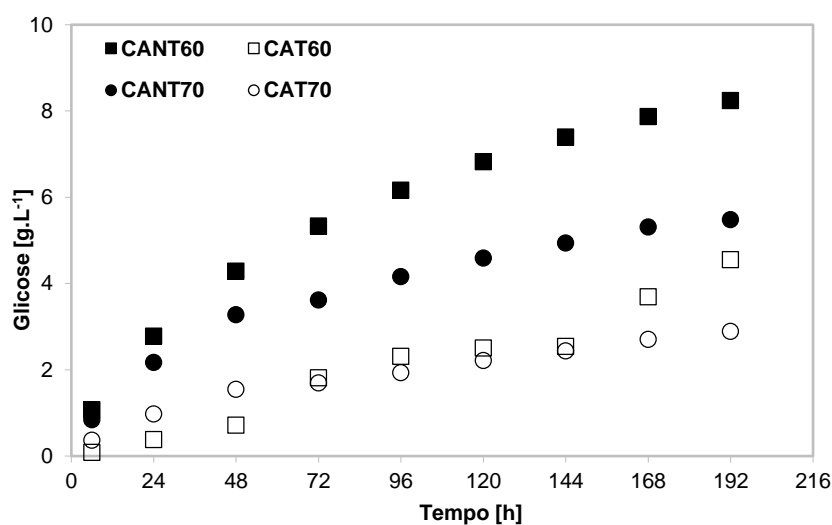
$$[C_{\text{Enz}}] = 0,002856$$

A atividade enzimática total do complexo enzimático foi realizada de acordo com a Equação 12. O valor da atividade do complexo enzimático obtido ( $129,57 \text{ FPU.mL}^{-1}$ ) foi utilizado para os cálculos de volume de enzima necessário para os ensaios de hidrólise.

### 3.5. Hidrólise Enzimática

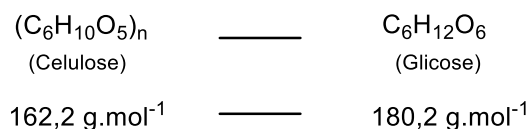
Os resultados obtidos no processo de hidrólise enzimática do caroço de açai *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT) em 192 horas (Figura 8), apresentaram taxas de conversão na temperatura de  $60^\circ\text{C}$  de 8,24 e 4,55% (CANT60 e CAT60) e na temperatura de  $70^\circ\text{C}$  de 5,48%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

**Figura 8.** Hidrólise enzimática do caroço de açai (Tubo de ensaio,  $C_0 = 40 \text{ g.L}^{-1}$ ).



Os resultados experimentais ficaram abaixo dos rendimentos teórico 44,47% e 24,59% (CANT e CAT60) e de 29,95% e 15,58% (CANT70 e CAT70). O rendimento experimental foi calculado pela razão entre a massa de resíduo seco em relação à massa de amostra. Para o

cálculo do rendimento teórico foi considerado a porcentagem de celulose determinada experimentalmente do caroço de açaí *in natura* (40,29%), sendo calculado de acordo com a equação estequiométrica:



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

### 3.6. Estudo Comparativo da Hidrólise Enzimática do Caroço de Açaí

Nesta etapa, objetivou-se realizar um estudo sobre a hidrólise enzimática do caroço de açaí *in natura* (CANT) e tratado com solvente (CAT), bem como comparar seu potencial como fonte de glicose. Nas Tabelas 4 e 5, são apresentados os resultados (médios) da hidrólise do caroço de açaí.

**Tabela 4.** Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 60 °C, V<sub>T</sub> = 250 mL, pH = 4,8).

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



168	11,50	28,64	71,09	64,00	7,57	18,88	46,85	42,18
192	13,68	34,08	84,58	76,15	9,22	22,99	57,06	51,37

**Tabela 5.** Hidrólise enzimática do caroço de açaí (T = 70 °C, V<sub>T</sub> = 250 mL, pH = 4,8).

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

De acordo com os resultados apresentados (Tabelas 4 e 5), as maiores concentrações de glicose foram obtidas para as polpas CANT60 (13,68 g.L<sup>-1</sup>) e CANT70 (11,59 g.L<sup>-1</sup>). As menores concentrações foram obtidas para as polpas CAT60 (9,22 g.L<sup>-1</sup>) e CAT70 (4,93 g.L<sup>-1</sup>). As maiores taxas de conversão de celulose em glicose obtidas em 192 h de reação foram de 84,58% (CANT60) e 71,80% (CANT70), as menores de 57,06% (CANT60) e 30,38% (CAT70).

Pelo cálculo estequiométrico de celulose convertidos em glicose é de 90,03%, ou seja, o CANT60 foi o que apresentou o melhor resultado (84,58%). O aumento da concentração de glicose com o decorrer do tempo, não foi constante a partir de um determinado tempo, o que

era de ser esperado, devido a diminuição da concentração de substrato para a enzima, ocasionando a diminuição da taxa de formação do produto. A eficiência das hidrólises enzimáticas para as polpas CANT60, CAT60, CANT70 e CAT70 foi de 40,29%. O cálculo da eficiência no processo de hidrólise do caroço de açaí foi realizado pela razão entre o rendimento experimental em relação ao rendimento teórico.

### 3.7. Fermentação Alcoólica

O hidrolisado do caroço de açaí (CANT60) obtido no Item 3.5.1 (melhor condição) foi submetido à fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, durante 24 horas, com as seguintes características: concentração inicial média de glicose de 13,68 g.L<sup>-1</sup> e pH de 4,5. Na Tabela 6, são apresentados os resultados da fermentação alcoólica do CANT60.

**Tabela 6.** Fermentação alcoólica do hidrolisado do CANT60 (T = 33 ± 1 °C, 24 h)

$C_{(EtOH)Teo}$ [g.L <sup>-1</sup> ]	$C_{(EtOH)Exp}$ [g.L <sup>-1</sup> ]	pH <sub>Final</sub>	Rend [%]	$Qp$ [g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	YP/S
5,8218	4,4360	5,15	87,08	0,1056	0,5869

De acordo com os dados da Tabela 6, podemos observar, que no final do processo fermentativo, a concentração de glicose residual foi de 0,049 g.L<sup>-1</sup>, a taxa de conversão de glicose em relação a concentração inicial do hidrolisado foi de 99,64%.

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

O rendimento de etanol (0,4451 g.g<sup>-1</sup>) foi inferior ao valor máximo teórico de conversão (0,511 g.g<sup>-1</sup>), correspondendo a 87,08% e o rendimento em produto ( $Y_{P/S} = 0,5869$

$\text{g.g}^{-1}$ ), foi superior quando comparado com valores citados na literatura ( $0,46 \text{ g.g}^{-1}$ ) para fermentações industriais (DAUGULIS e SWAINE, 1987; LIMA, BASSO e AMORIM, 2001 e LIMA e MARCONDES, 2002). A produtividade de etanol ( $Q_p = 0,1056 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em 24 horas de reação, está abaixo dos valores encontrados na literatura para reações de fermentação em batelada,  $6,85\text{-}9,88 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (TOSETTO, 2002) e de  $5,97\text{-}9,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (FERREIRA, 2005).

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

#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que o caroço de açaí sem tratamento (CANT60), mostrou ser uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol de segunda geração, por conter um alto teor de celulose (40,29%).

O rendimento em glicose na reação de hidrólise do caroço de açaí sem tratamento (CANT60) foi de  $13,687 \text{ g.L}^{-1}$ .

A glicose ( $13,687 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtida pela hidrólise enzimática do caroço de açaí foi bem assimilada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol.

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

O etanol obtido após destilação, correspondeu a 87,08% em relação a concentração inicial de glicose ( $13,68 \text{ g.L}^{-1}$ ).

#### AGRADECIMENTOS

A Novozymes Latin América (Araucária, PR) pelo fornecimento das enzimas comerciais empregadas neste estudo.

## REFERÊNCIAS

ALTMAN, F. F. A. O caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Belém, Brasil, Instituto Agrônômico. Boletim Técnico n.31, 1956.

American Society for Testing and Materials. ASTM D 3174-04. Standard method for ash in the analysis sample of coal and coke; 2004.

American Society for Testing and Materials. ASTM D 3175-07. Standard method for volatile matter in the analysis sample of coal; 2007.

American Society for Testing and Materials. ASTM D6316-09b; Determination of combustible and carbonate carbon in solid residues from coal and coke, American Society for Testing and Materials (ASTM): Pennsylvania, 2009.

ASAE. Standards Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. ASAE, S319.3, p.547, 1998.

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 17<sup>a</sup> ed. Washington: AOAC. 2002.

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev. Gaithersburg: Published by AOAC International, v.2, cap. 32, p.1-43, 1997.

BUFFIERE, P.; LOISEL, D. Dosage des fibres VAN SOEST, Weened. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-14, 2007.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Açaí, Safra. 2015/2016. Terceiro levantamento, setembro de 2016.

CORDEIRO, M. A. Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) para a produção de etanol / Marcio de Andrade Cordeiro. - 2016.

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

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

FIORI, L., BASSI, D., and COSTA, P., Seed Oil Supercritical Extraction: Particle Size Distribution of the Milled Seeds and Modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 174-181 2008.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure & Appl. Chem.*, Vol.59, n.2, Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India , p.257-268, 1987.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da extração vegetal e da silvicultura. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?&t=resultados>. Acesso em: 22 fev. 2018.

ITO, E. N.; MARCONCINI, J. M.; PESSOA, J. D. C.; RIOS, C. T.; MATTOSO, L. H. C.; HAGE JR, E. Caracterização de compósitos de poliolefinas recicladas com fibras de açaí. *Anais do 9o Congresso Brasileiro de Polímeros*, 2007.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of chemical terminology*. 2.ed. 1997. (IUPAC Golden Book). Disponível em: Acesso em: 22 fev. 2018.

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

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

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. *Álcool carburante: uma estratégia brasileira*. Ed. UFPR, Curitiba, 2002. 248p.

LIMA, U. A. *Aguardente: fabricacao em pequenas destilarias*. 1a ed. Piracicaba: Fundacao de Estudos Agrarios Luiz de Queiroz, 1999. 187p.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Biologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. vol.1, cap.1: Produção de Etanol, p.1-43, 2001.

LIU, Z. H.; QIN L.; PANG F.; JIN, M. J.; LI, B. Z.; KANG Y.; DALEC, B. E. YUANA, Y. J. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*, v.44, p.176-184, 2013.

MARABEZI, Karen. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-deaçúcar. Universidade Federal de São Carlos p.52, São Carlos. 2009.

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

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

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; LEMO, V.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO; COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid-state fermentation. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS - SBPMat, 7., 2008, Guarujá; BRAZILIAN MRS MEETING, 7., 2008, Guarujá. Abstracts. Rio de Janeiro: SBPMat, 2008.

SEDEME - Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Mineração e Energia. Disponível em: <http://para2030.com.br/caroco-de-acai-pode-virar-fonte-de-energia>. Acesso em: 16 jul. 2017.

SILVA, I. T.; ROCHA, B. R. P.; Energia de biomassa, agricultura familiar e inserção social em contribuição ao desenvolvimento sustentável nas comunidades isoladas do Estado do Pará. ANAIS DO SIMPÓSIO AMAZÔNIA, CIDADES E GEOPOLÍTICAS DAS ÁGUAS. Projeto MEGAM. v. único. p.172-173, 2003.

SILVA, I. T.; ROCHA, B.R.P.; Energia de biomassa, agricultura familiar e inserção social em contribuição ao desenvolvimento sustentável nas comunidades isoladas do Estado do Pará. ANAIS DO SIMPÓSIO AMAZÔNIA, CIDADES E GEOPOLÍTICAS DAS ÁGUAS, 2003. Projeto MEGAM. v. único. p. 172-173.

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

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

TEXEIRA, L. B.; GERMANO, V. L. C.; OLIVEIRA, R. F.; FURLAN JR, J.; Processo de compostagem usando resíduos agroindústrias de açaí e de palmito de açazeiro. *Circular técnica* 41, 2005.

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

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

UPDEGRAFF, D. M.; Anal. Biochem. 32, 420, 1969.

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

ZUNIGA. U. F. R.; FARINAS.C. F.; BERTUCCI NETO.V.; LEMOS. V.; Produção de Complexos Lignocelulíticos em Substratos Derivados de Resíduos Agroindustriais por Fermentação semi sólida. IV workshop de biocatálise e biotransformação, 2008.