



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE ETANOL POR HIDRÓLISE ÁCIDA DE MELAÇO DE  
SOJA**

**Betânia Braz Romão**

**UBERLÂNDIA - MG**  
**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



## **PRODUÇÃO DE ETANOL POR HIDRÓLISE ÁCIDA DE MELAÇO DE SOJA**

**Betânia Braz Romão**

Orientadoras:

Dra. Miriam Maria de Resende

Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

**UBERLÂNDIA - MG**  
**2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

---

R761p Romão, Betânia Braz, 1984-  
Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja / Betânia  
Braz Romão. - 2011.  
78 f. : il.

Orientadoras: Miriam Maria de Resende e Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Álcool - Teses. Soja - Teses. I. Resende, Miriam Maria de. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

---

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 19/07/2011.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende  
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso  
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Miria Hespanhol M. Reis  
Professora (FEQUI/UFU)



Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Juliana de Souza Ferreira  
Professora (FEQUI/UFU)



Prof.<sup>o</sup>. Dr. Ruy de Sousa Júnior  
Professor (DEQ/UFSCar)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por iluminar o meu caminho possibilitando assim que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, João Batista e Neiva, pelo carinho, amor, compreensão, renúncia e dedicação, sempre me apoiando. Ao meu irmão, Fabiano, que com sua alegria contagiante me ensinou a admirar a simplicidade da vida. A todos os meus familiares que torceram por mim.

À Prof<sup>a</sup>. Miriam Maria Resende pela orientação, por toda a ajuda, dedicação e paciência, durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso, pela orientação, por toda a dedicação, paciência e confiança, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo.

Às minhas amigas Nádia, Taciana, Larissa e a minha prima Suelén pela amizade incondicional, pelo apoio e carinho.

Aos colegas de laboratório, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento profissional: Maurielem, Nattácia, Fran, Cida, Carla, Janaína, Rafael, Wesley, Ruy, Jefferson, Daynna, Priscilla, Curt, Gustavo, Thiago, Magno, Wilson, Henrique e Alex. Obrigada pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos funcionários da FEQUI: Silvino, Cléo, Roberta e José Henrique pela colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro.

Aos meus pais e meu irmão.

“Nunca, jamais desanimeis,  
embora venham ventos contrários.”

(Santa Paulina)

---

## SUMÁRIO

---

|                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------|------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                    | <b>i</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                    | <b>iv</b>  |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>                                   | <b>v</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>                                              | <b>vi</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                            | <b>vii</b> |
| <br>                                                            |            |
| <b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>                             | <b>1</b>   |
| <br>                                                            |            |
| <b>CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....</b>                              | <b>3</b>   |
| 2.1 – Geral.....                                                | 3          |
| 2.2 – Específico.....                                           | 3          |
| <br>                                                            |            |
| <b>CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                  | <b>5</b>   |
| 3.1 – A soja.....                                               | 5          |
| 3.2 – A composição da soja.....                                 | 6          |
| 3.3 – Produtos da soja.....                                     | 9          |
| 3.4 – Processamento da soja.....                                | 10         |
| 3.5 – Melaço de soja.....                                       | 13         |
| 3.6 – Hidrólise Ácida.....                                      | 15         |
| 3.6.1 – Processo com ácido concentrado.....                     | 15         |
| 3.6.2 – Processo com ácido diluído.....                         | 15         |
| 3.7 – Histórico da fermentação alcoólica.....                   | 16         |
| 3.8 – Processos fermentativos.....                              | 17         |
| 3.8.1 – Batelada.....                                           | 17         |
| 3.8.2 – Batelada Alimentada.....                                | 17         |
| 3.8.3 – Processo Contínuo.....                                  | 18         |
| 3.9 – Microrganismo da Fermentação Alcoólica.....               | 19         |
| 3.10 – Bioquímica da Fermentação Alcoólica.....                 | 20         |
| 3.11 – Fatores que influenciam na Fermentação Alcoólica.....    | 21         |
| 3.11.1 – Temperatura.....                                       | 21         |
| 3.11.2 – pH do meio.....                                        | 22         |
| 3.11.3 – Presença de sulfito no meio.....                       | 23         |
| 3.11.4 – Presença de ácidos orgânicos no meio.....              | 24         |
| <br>                                                            |            |
| <b>CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                     | <b>25</b>  |
| 4.1 – Micro-organismo.....                                      | 25         |
| 4.2 – Matéria-prima: Fonte de carbono.....                      | 25         |
| 4.3 – Ácidos utilizados na hidrólise.....                       | 25         |
| 4.4 – Testes Preliminares.....                                  | 25         |
| 4.5 – Metodologia Experimental.....                             | 26         |
| 4.5.1 - Planejamento experimental fatorial 3 <sup>K</sup> ..... | 27         |
| 4.5.2 – Avaliação da concentração de inóculo.....               | 30         |
| 4.5.3 – Cinética para avaliar a melhor condição definida.....   | 30         |

|                                                                                                                                |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 4.5.4 – Extração de etanol utilizando Evaporador Rotativo.....                                                                 | 30            |
| <b>4.6 – Determinação do crescimento celular.....</b>                                                                          | <b>31</b>     |
| <b>4.7 – Determinação do açúcar total .....</b>                                                                                | <b>32</b>     |
| <b>4.8 – Determinação de Etanol.....</b>                                                                                       | <b>33</b>     |
| <b>4.9 – Rendimento.....</b>                                                                                                   | <b>33</b>     |
| <b>4.10 – Produtividade.....</b>                                                                                               | <b>34</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                            | <br><b>35</b> |
| 5.1 – Testes preliminares.....                                                                                                 | 35            |
| 5.2 – Planejamento experimentais visando a seleção dos ácidos estudados.....                                                   | 39            |
| 5.2.1 – Planejamento fatorial a 3 níveis para H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....                                             | 39            |
| 5.2.1.1 Rendimento de etanol.....                                                                                              | 41            |
| 5.2.1.2 Açúcar total residual.....                                                                                             | 43            |
| 5.2.2 - Planejamento fatorial a 3 níveis para HCl.....                                                                         | 46            |
| 5.2.2.1 Rendimento de etanol.....                                                                                              | 47            |
| 5.2.2.2 Açúcar total residual.....                                                                                             | 50            |
| 5.2.3 - Planejamento fatorial a 3 níveis para HNO <sub>3</sub> .....                                                           | 53            |
| 5.2.3.1 Rendimento de etanol.....                                                                                              | 54            |
| 5.2.3.2 Açúcar total residual.....                                                                                             | 56            |
| 5.3 – Comparação entre os três ácidos testados.....                                                                            | 59            |
| 5.4 – Reprodutibilidade do processo fermentativo nas melhores condições experimentais.....                                     | 60            |
| 5.5 – Análise da influência da concentração de inóculo no rendimento de etanol.....                                            | 61            |
| 5.6 – Cinética para avaliar o melhor tempo de fermentação no reator, empregando condições otimizadas para o ácido nítrico..... | 61            |
| 5.7 – Extração de etanol utilizando Evaporador Rotativo.....                                                                   | 64            |
| <br><b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>                                                                            | <br><b>67</b> |
| <br><b>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                        | <br><b>69</b> |
| <br><b>CAPÍTULO 8 – APÊNDICE.....</b>                                                                                          | <br><b>76</b> |

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.1 – Receitas do complexo soja e participação do complexo soja nas receitas cambiais (Fonte: Abiove,2011) .....                                                 | 6  |
| Figura 3.2 – Estrutura molecular dos principais açúcares da soja (1) estaquiose, (2) rafinose e (3) sacarose .....                                                      | 9  |
| Figura 3.3 – Fluxograma do processo de obtenção do óleo degomado e do farelo de soja (adaptado Fernandes Júnior, 2009).....                                             | 12 |
| Figura 3.4 – Fluxograma do balanço de massa para processamento da soja. (adaptado Siqueira, 2007).....                                                                  | 13 |
| Figura 3.5 – Fluxograma do processo de obtenção do melaço de soja (adaptado Siqueira, 2007) .....                                                                       | 14 |
| Figura 3.6 – Fluxograma simplificado da conversão de glicose a etanol (Fonte: Galassi, 2007).....                                                                       | 21 |
| Figura 4.1 – Unidade utilizada nos experimentos.....                                                                                                                    | 27 |
| Figura 4.2 – Evaporador Rotativo(Fonte: Fisatom).....                                                                                                                   | 31 |
| Figura 4.3 – Câmara de NeuBauer (Fonte: Barga, 2007) .....                                                                                                              | 32 |
| Figura. 5.1 – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido sulfúrico ..... | 38 |
| Figura 5.2 – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido clorídrico ..... | 38 |
| Figura. 5.3 – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido nítrico .....   | 39 |
| Figura 5.4 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta rendimento de etanol.....                                                                         | 41 |
| Figura 5.5 – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.....                                                                           | 42 |
| Figura 5.6 – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.....                                                                                        | 42 |
| Figura 5.7 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento de etanol em função do pH e da pressão.....                                  | 43 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5.8 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta ATF.....                                                         | 44 |
| Figura 5.9 – Valores preditos em função dos observados relativos ATF.....                                                              | 45 |
| Figura 5.10 – Distribuição dos resíduos para a resposta ATF.....                                                                       | 45 |
| Figura 5.11 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta ATF em função do pH e pressão.....                    | 46 |
| Figura. 5.12 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta rendimento de etanol.....                                      | 48 |
| Figura 5.13 – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.....                                         | 49 |
| Figura 5.14 – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.....                                                      | 49 |
| Figura 5.15 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol em função do pH e pressão..... | 50 |
| Figura 5.16 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta ATF.....                                                        | 51 |
| Figura 5.17 – Valores preditos em função dos observados relativos ATF.....                                                             | 52 |
| Figura 5.18 – Distribuição dos resíduos para a resposta ATF.....                                                                       | 52 |
| Figura 5.19 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta ATF em função do pH e pressão .....                           | 53 |
| Figura 5.20 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta rendimento de etanol.....                                       | 54 |
| Figura 5.21 – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.....                                         | 55 |
| Figura 5.22 – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.....                                                      | 56 |
| Figura 23 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento de etanol em função do pH e pressão.....     | 56 |
| Figura 5.24 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta ATF.....                                                        | 57 |
| Figura 5.25 – Valores preditos em função dos observados relativos ATF.....                                                             | 58 |
| Figura 5.26 – Distribuição dos resíduos para a resposta ATF. ....                                                                      | 58 |
| Figura 5.27 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta ATF em função do pH e pressão.....                    | 59 |

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura. 5.28 – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido nítrico nas condições otimizadas..... | 62 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

---

**LISTA DE TABELAS**

---

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1 – Exportações do complexo soja, previsão para a safra de 2011/2012.....                                         | 5  |
| Tabela 3.2 – Valor nutricional em 100g da soja cozida sem sal.....                                                         | 7  |
| Tabela 3.3 – Composição do melaço de soja.....                                                                             | 14 |
| Tabela. 4.1 – Matriz do planejamento experimental fatorial $3^2$ com os valores codificados e originais das variáveis..... | 28 |
| Tabela – 5.1 Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando $H_2SO_4$ .....                                        | 35 |
| Tabela – 5.2 Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando $HCl$ .....                                            | 36 |
| Tabela – 5.3 Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando $HNO_3$ .....                                          | 36 |
| Tabela 5.4 – Matriz do planejamento experimental fatorial $3^2$ para $H_2SO_4$ valor real e codificado.....                | 40 |
| Tabela. 5.5 – Matriz do planejamento experimental fatorial $3^2$ para $HCl$ valor real e codificado.....                   | 47 |
| Tabela. 5.6 – Matriz do planejamento experimental fatorial $3^2$ para $HNO_3$ valor real e codificado.....                 | 54 |
| Tabela. 5.7 – Resultados das melhores respostas para cada ácido testado.....                                               | 60 |
| Tabela. 5.8 – Comparativo entre os resultados dos modelos e dos experimentos na condição otimizada.....                    | 60 |
| Tabela. 5.9 – Resultados dos experimentos variando a concentração de inóculo para pressão de 1,5 atm.....                  | 61 |
| Tabela 5.10 – Resultados dos experimentos usando evaporador rotativo.....                                                  | 65 |

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

a, b, c,...p - Parâmetros da equação

AT - Concentração de açúcar total g/L

AT<sub>I</sub> - Concentração de açúcar total inicial g/L

AT<sub>F</sub> - Concentração de açúcar total residual g/L

CE - concentração de etanol g/L

K - Número de variáveis estudadas no planejamento experimental

P<sub>etanol</sub> - Produtividade do etanol g/ L.h

PF - Planejamento fatorial

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

X<sub>+1</sub> - Valor da variável no nível superior

X<sub>0</sub> - Valor da variável no ponto central

X<sub>-1</sub> - Valor da variável no nível inferior

X<sub>n</sub> - valor codificado da variável (n = 1,2...)

X<sub>1</sub> - Pressão absoluta de hidrólise;

X<sub>2</sub> - pH de hidrólise

Y<sub>P/S0</sub> - Rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais iniciais (%)

Y<sub>P/S</sub> - Rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%)

β<sub>0</sub> - Valor médio da resposta

---

## RESUMO

---

A fabricação de preparados de soja ricos em proteínas isentos de oligossacarídeos flatulentos como rafinose e estaquiose gera um efluente que apresenta quantidades consideráveis de carboidratos. Nos últimos anos vem se observando no mundo um grande interesse pela utilização de resíduos agrícolas na obtenção de combustíveis renováveis, tais como o bioetanol. Dessa forma, no presente trabalho estudou-se o aproveitamento deste resíduo denominado de melaço de soja em processos de hidrólise ácida seguida de fermentação submersa por *Saccharomyces cerevisiae*. Avaliou-se a influência do tipo de ácido, do pH e da pressão absoluta de hidrólise na resposta rendimento de etanol e concentração de açúcar total residual por meio de um planejamento fatorial, no qual o pH variou de 3 a 5, a pressão absoluta variou de 1 a 2 atm e os ácidos estudados foram sulfúrico, clorídrico e nítrico. Fixou-se o tempo de hidrólise em 20 min, a diluição do melaço em 1:4 (250 g<sub>melaço</sub>/1000 g<sub>meio</sub>) e o tempo de fermentação em 12 horas para o ácido nítrico e 14 para os ácidos clorídrico e sulfúrico com base nos testes preliminares realizados. Os experimentos ocorreram em um reator batelada *Applikon* com volume útil de 1,5 L, velocidade de agitação de 230 rpm e concentração de inóculo de 30 g/L sendo o volume de inóculo 30% do volume total. Os resultados do planejamento fatorial mostraram que para todos os ácidos estudados os pontos centrais de pH (4) e pressão (1,5 atm) foram os que apresentaram maior rendimento de etanol sendo 46% para o ácido sulfúrico, 48% para o ácido clorídrico e 54% para o ácido nítrico. Analisando a curva de contorno definiu-se a condição ótima de trabalho para pH (4,5) e pressão (1,5 atm) por satisfazer a hidrólise e a fermentação. Como o ácido nítrico foi o que apresentou melhor rendimento de etanol realizou-se um teste para avaliar a concentração de inóculo na fermentação e as concentrações testadas foram 25, 30, 35, 40 e 45 g/L. A concentração escolhida foi de 35 g/L com um rendimento de 57 %. Definidas todas as condições, fez-se uma cinética para avaliar o tempo de fermentação e as condições foram pH de hidrólise e fermentação 4,5, pressão absoluta de hidrólise 1,5 atm, temperatura da fermentação  $35 \pm 0,5$  °C, agitação 230 rpm e concentração de inóculo de  $35 \pm 0,2$  g/L. A estabilização da produção de etanol ocorreu com 14 horas de fermentação apresentando um rendimento em relação ao açúcar inicial de 62 %. Avaliou-se a fermentação do melaço de soja mais concentrado retirando o etanol através de um evaporador rotativo e fermentando novamente o caldo resultante. Após três fermentações o rendimento obtido em relação ao açúcar total consumido foi de 73%

Palavras-chave: Hidrólise ácida, melaço de soja, etanol.

---

**ABSTRACT**

---

The manufacture of soybean preparations rich in protein free of flatulent oligosaccharides as raffinose and stachyose generates an effluent that has considerable amounts of carbohydrates. In recent years the world has been watching a great interest in the use of agricultural residues in obtaining renewable fuels such as bioethanol. In the present work the use of this residue called molasses soybean was studied in processes of acidic hydrolysis followed by submerged fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. It was evaluated the influence of acid type, pH, and the absolute pressure of hydrolysis in ethanol yield and concentration of residual total sugar using a factorial design in which the pH ranged from 3 to 5, the absolute pressure ranged from 1 to 2 atm and acids studied were sulfuric, hydrochloric and nitric. Settled the hydrolysis time of 20 min, in 1:4 dilution of molasses (250 gmelaço/1000 gmeio) and fermentation time of 12 hours for the nitric acid and for 14 hours foil the sulfuric and hydrochloric acids on the basis of preliminary tests performed. The experiments occurred in a batch reactor Applikon useful volume of 1.5 L, agitation speed 230 rpm and inoculum concentration 30 g/L with the volume of inoculum 30% of the total volume. The results of the factorial design showed that for all acids studied the central points of pH (4) and pressure (1.5 atm) were those with the highest ethanol yield being 46% for sulfuric acid, 48% for hydrochloric acid and 54% for nitric acid. Analyzing the contour curve defined the optimal working conditions for pH (4.5) and pressure (1.5 atm) to satisfy the hydrolysis and fermentation. As nitric acid showed the best ethanol yield was carried out a test to measure the concentration of inoculum in the fermentation and the concentrations tested were 25, 30, 35, 40 and 45 g/L. The chosen concentration was 35 g/L with a yield of 57%. Set all the conditions, it was carried out a kinetic study to assess for fermentation time and conditions were pH 4.5 hydrolysis and fermentation, absolute pressure of 1.5 atm hydrolysis, fermentation temperature  $35 \pm 0.5$  °C shaker 230 rpm, inoculum concentration of  $35 \pm 0.2$  g / L. The stabilization of ethanol production occurred around ran 14 hours of fermentation with ethanol yield in relation to the initial sugar 62%. The soybean molasses fermentation was evaluated by removing the more concentrated ethanol in a rotary evaporator and fermenting the juice again. After three fermentations, ethanol yield in relation to the total sugar consumed was 73%.

Keywords: Acidic hydrolysis, soybean molasses, ethanol.

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

Uma das preocupações do mundo atual é com o suprimento de energia nas próximas décadas, uma vez que a principal fonte de energia utilizada hoje é o petróleo, e por se tratar de combustível fóssil não é renovável. O petróleo ainda representa 40% da energia utilizada no mundo, e até 2020 o consumo saltará dos atuais 85 milhões de barris/dia para 110 milhões de barris/dia, ou seja, 31 bilhões de barris/ano para 40 bilhões de barris/ano. E ainda, o recente retorno aos aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental (BASTOS, 2007).

O etanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição causada por estes. Como combustível, as características do etanol quanto a emissões derivam de: possuir baixa toxicidade, comparado com o diesel e gasolina; ter 34,7% de oxigênio, exigindo menor relação ar/combustível, gerando emissões menores; não ter enxofre; ter menor reatividade fotoquímica que os HC no diesel e gasolina, reduzindo as emissões de precursores de *smog* fotoquímico; como molécula única, com baixo teor de carbono, quase não forma particulados; ser biodegradável. Finalmente, como elevador de octanagem, substitui aditivos como o metil terc-butil éter (MTBE), etil terc-butil éter (ETBE), chumbo, e outros com emissões indesejáveis (MACEDO et al., 2005).

Devido à crise do petróleo no início da década de 70, o governo brasileiro investiu na produção de álcool, implantando o Proálcool (Programa Nacional de Álcool), em 1975. Com isso, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a desenvolver um programa alternativo de combustíveis para substituição à gasolina. Optou-se, então, pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar por via fermentativa, em razão da baixa nos preços do açúcar na época. No início do século XXI, na certeza de escassez e de crescente elevação no preço dos combustíveis fósseis, priorizam-se novamente os investimentos na pesquisa e produção de etanol (ALTINTAS et al., 2002).

A produção brasileira de etanol vem crescendo desde a safra 2000/2001, saltando de aproximadamente dez milhões e quinhentos mil metros cúbicos para algo em torno de vinte e sete milhões e quinhentos mil metros cúbicos de etanol, contabilizando etanol hidratado e

anidro. Essa produção corresponde a um salto de moagem que partiu de aproximadamente duzentos e cinquenta e sete milhões de toneladas, na safra 2000/2001, para quinhentas e sessenta e nove milhões de toneladas de cana moída na safra 2008/2009 (UNICA, 2011).

Embora no Brasil o uso da cana de açúcar para produção de álcool seja muito bem sucedido, outras matérias primas podem ser consideradas futuramente. Estas matérias primas podem possibilitar a produção em regiões sem vocação agrícola para aquela cultura, ou visar o aproveitamento de resíduos agrícolas, com a inclusão de pequenos produtores usando materiais amiláceos como batata, mandioca e batata-doce, principalmente pelo aproveitamento das perdas resultantes da produção agrícola.

Nos últimos anos a utilização de resíduos agrícolas na obtenção de combustíveis renováveis, tais como o bioetanol tem ganhado grande interesse e apesar da grande produção deste combustível a partir da sacarose de cana de açúcar, a produção de álcool de fontes alternativas de substrato pode ser interessante, principalmente se associada à indústria já existente (NEUREITER et al., 2002; BANERJEE & PANDEY, 2002; KARR et al., 1998).

A soja é uma das mais importantes fontes para a alimentação de homens e animais domésticos, principalmente devido ao elevado valor nutricional de suas frações lipídicas e protéicas (SEDIYMA, 1989; MORAIS & SILVA, 1996). Ela apresenta em sua constituição proteínas de alta qualidade e elevada quantidade de energia. O grão de soja possui alto teor de lipídeos (15-25%) e um elevado teor de proteínas (30-45%), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação. O grão de soja possui também um considerável teor de carboidratos (20-35%), o que atribui a este alimento um alto valor energético (MOREIRA, 1999).

O melaço de soja é um co-produto, obtido na extração protéica da soja, com alta concentração de açúcares (57% peso seco), nitrogênio e outros macro e micronutrientes. Os principais açúcares presentes neste melaço e que podem ser convertidos em etanol são sacarose, glicose e frutose. Considerando que 47% dos açúcares totais no melaço de soja não são fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* existe neste substrato um potencial produtor de etanol. Da estaquiose e rafinose, somente a unidade terminal frutose é consumida. Os açúcares residuais são oligômeros ligados por uma ligação alfa-1,6 (SIQUEIRA, 2007).

Uma vez que as *Saccharomyces cerevisiae* não produzem a enzima alfa-1,6-galactosidase, assim, faz-se necessária a hidrólise desses açúcares antes de começar a fermentação. Diante desse contexto o presente trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade da produção de etanol no hidrolisado ácido do melaço de soja por fermentação submersa utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*.

---

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

---

#### 2.1 - Geral

Este trabalho possui como objetivo geral estudar o aproveitamento do resíduo industrial (melaço de soja) proveniente de plantas de processamento de proteína isolada de soja como substrato para a produção de etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.2 - Específicos

- Selecionar entre os ácidos o que promove melhor condição de hidrólise e consequentemente maior produção de etanol;
- Otimizar as condições de hidrólise ácida do melaço de soja para o ácido selecionado;
- Avaliar a cinética da fermentação na condição selecionada;
- Avaliar a fermentação em uma menor diluição do substrato.

---

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 - A soja

Assim como o feijão, a lentilha e a ervilha, a soja é uma leguminosa pertencente à Família *Fabaceae* denominada cientificamente de *Glycine Max* (L) e compreende mais de 7000 espécies. A palavra soja vem do japonês *shoyu* e é originária do continente asiático, sobretudo da região do rio Yang-Tsé, na China. Ela é considerada um grão rico em proteínas, cultivado como alimento tanto para humanos quanto para animais (STRÖHER, 2010).

A soja é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo devido a sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional. É amplamente consumida pela população, na forma de óleo e seus derivados, como margarina e gordura hidrogenada (KHARE & KRISHNA, 1994).

O Brasil é responsável por cerca de 22% do volume total de soja exportado, sendo o segundo maior exportador de soja do mundo. Em média, 68% do total produzido no país é exportado, principalmente para a União Européia, EUA e Japão. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2011), a estimativa para a próxima safra é de que a produção de soja ultrapasse 71 milhões de toneladas e que o volume total de soja e derivados que será exportado ultrapasse 45 milhões de toneladas, conforme demonstrado na Tabela 3.1 e nas receitas ilustradas na Figura 3.1.

**Tabela 3.1** – Exportações do complexo soja, previsão para a safra de 2011/2012.

| Safra 2011<br>(Previsão) | Volume<br>(1000 toneladas) | Valor<br>(US\$/toneladas) | Valor<br>(US\$ milhões) |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Soja em Grão             | 31500                      | 480                       | 15120                   |
| Farelo de Soja           | 13900                      | 385                       | 5325                    |
| Óleo de soja             | 1450                       | 1100                      | 1595                    |
| Total                    | 46850                      | 1965                      | 22067                   |

Fonte: ABIOVE, 2011.

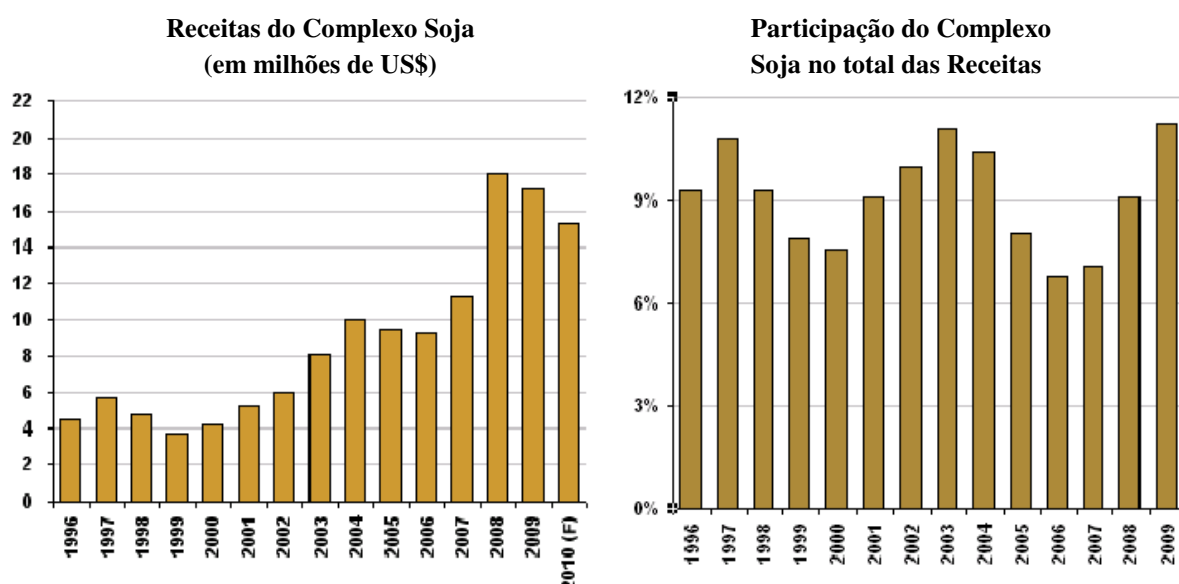


**Figura 3.1** – Receitas e participação do complexo soja nas receitas cambiais.

Fonte: ABIOVE, (2011).

Nos últimos anos, uma grande atenção vem sendo dada à soja e um dos fatores é o fato desta leguminosa ser rica em substâncias que podem prevenir a ocorrência de uma série de doenças, o que a caracteriza como um alimento funcional. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos funcionais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos por meio da atuação de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano.

Sirtori et al. (2001) destacam que os altos teores de isoflavonas presente em derivados de soja podem ser diretamente relacionados com atividade anti-carcinogênicas e com a prevenção de doenças coronárias. Também, Anderson et al. (1999) destacam que a ingestão desta leguminosa, pela ação de suas fibras, pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol e para o aumento da tolerância a glicose em diabéticos. Segundo Scheppach *et al.* (2004), a ingestão de derivados de soja reduz a ocorrência de processos inflamatórios e carcinogênicos do trato digestivo.

### 3.2 - A composição da soja

O valor nutricional da soja prende-se ao seu alto teor de proteínas de fácil digestão, rica em aminoácidos essenciais e fonte de óleo de boa qualidade (ARAÚJO et al., 1986).

A soja apresenta em sua constituição proteínas de alta qualidade e elevada quantidade de energia e a sua composição pode ser afetada pelas condições climáticas e pela variedade genética. O grão de soja possui alto teor de lipídios (15-25 %) e um elevado teor de proteínas

(30-45 %), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação. O grão de soja possui também um considerável teor de carboidratos (20-35 %), o que atribui a este alimento um alto valor energético (MOREIRA, 1999).

A soja é um alimento rico em minerais como magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco e potássio, porém, o aproveitamento desses minerais pode ser prejudicados devido a fatores antinutricionais como os taninos e fitatos (MONTEIRO, 2000). A Tabela 2 apresenta os valores nutricionais da soja cozida.

**Tabela 3.2** – Valor nutricional em 100g da soja cozida sem sal.

| Componentes       | Valor |
|-------------------|-------|
| Energia (Kcal)    | 141   |
| Água (g)          | 67    |
| Proteína (g)      | 12,5  |
| Lipídios (g)      | 7,5   |
| Saturada (g)      | 1     |
| Monosaturada (g)  | 1,7   |
| Polinsaturada (g) | 4,5   |
| Carboidratos (g)  | 5,6   |
| Vitamina E (g)    | 1     |
| Cálcio (mg)       | 82    |
| Ferro (mg)        | 2,6   |
| Magnésio (mg)     | 84    |
| Potássio (mg)     | 513   |

Fonte: PORTO e OLIVEIRA, (2006).

Os grãos de soja, como a maioria das espécies de leguminosas, contêm proteínas tóxicas e de ação antinutricional, tendo que, por esse motivo, receber tratamento térmico adequado antes de ser usada na alimentação (SGARBIERI, 1996).

A soja possui quantidade considerável de carboidratos, porém apenas 2% deste valor se encontram sob a forma de amido absorvível pelo organismo humano, razão pela qual o grão é indicado na dieta de pessoas diabéticas e obesas para a manutenção e perda de peso. Os carboidratos da soja são usados principalmente em rações animais (predominantemente em rações para ruminantes) com a finalidade de somar calorias às dietas animais. Apesar da

complexidade dos carboidratos da soja, estes não passam por nenhum processamento pois não há ganho de valor nutricional pela quebra de açúcares nestas rações animais (IRISH, 1998).

Os carboidratos insolúveis são celulose e hemicelulose encontrados na casca do grão, os quais constituem as fibras que auxiliam na digestão dos alimentos. Outros polímeros semelhantes a celulose como as pentosanas, galactanas, hemicelulose e dextrinas também podem ser encontradas na soja. O amido está presente na soja, porém em quantidades muito pequenas (STRÖHER, 2010).

É certo afirmar que a soja é composta de sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose, melibiose, galactose, ramnose e maltopentose. Os principais açúcares são a sacarose, que compõe cerca de 50% do açúcar da soja, a rafinose e a estaquiose, que juntas perfazem quase os 50% restantes. Os demais açúcares representam de 0,5 a 1% do total. A glicose, por exemplo, nem era detectada na soja antes do aparecimento de técnicas instrumentais precisas para sua análise, e ainda hoje é discutida a sua presença na soja madura (SILVA et al., 1990). Entretanto, a soja verde apresenta grandes quantidades de pentoses e hexoses que vão se combinando durante o amadurecimento, restando por fim apenas traços destes açúcares provenientes de sínteses incompletas e possíveis degradações de açúcares mais complexos.

A sacarose, representada na Figura 3.2, é um dissacarídeo não redutor, facilmente hidrolisado por soluções diluídas de ácidos minerais ou por enzimas (invertases) com a formação de glicose e frutose. Depois da sacarose, a rafinose, mostrada na Figura 3.2, é o oligossacarídeo mais frequente em vegetais. É também conhecida como galactosilsacarose; é um trissacarídeo não redutor, sendo encontrado em grande quantidade no melaço e no açúcar-de-cana não refinado. Por hidrólise total da rafinose, são obtidos galactose, frutose e glicose. Por invertases, este açúcar pode ser hidrolisado à frutose e melibiose. Este açúcar não é absorvido pelo corpo humano e, por esse motivo, pode causar desconforto intestinal com produção de gases. A rafinose é hidrolisada por algumas cepas de fungos como o *Aspergillus fumigatus* (REZENDE & FELIX, 1997) e a *Mortierella vinacea dixo* (THANANUNKUL et al., 1976). A estaquiose, Figura 3.2, é um tetrassacarídeo não redutor pertencente à família da rafinose encontrado principalmente em leguminosas como a soja. Devido à complexidade das moléculas esses oligossacarídeos são de difícil digestão e causam sintomas de flatulência. A germinação, no caso da produção de brotos de soja, e a fermentação são processos que mobilizam esses açúcares, reduzindo os problemas de flatulência (STRÖHER, 2010). Por causa das suas propriedades, este açúcar vem sendo explorado para a formação de ácidos graxos esterificados, a fim de produzir óleos vegetais com menos calorias. A forma conjugada

de ácidos graxos com rafinose tem uma menor absorção no trato intestinal humano (AKOH & SWANSON, 1987).

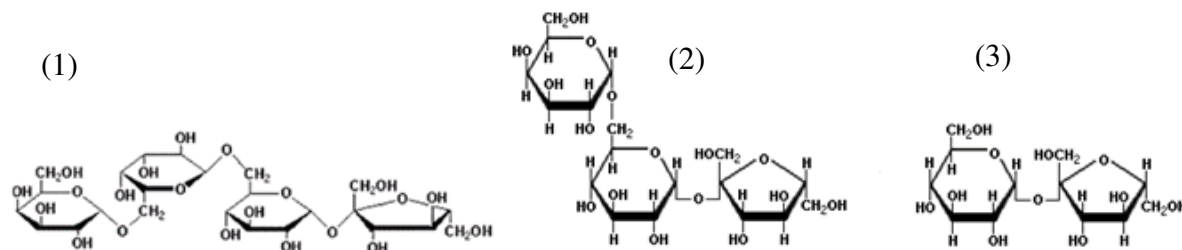


**Figura 3.2** – Estrutura molecular dos principais açúcares da soja (1) estaquiose, (2) rafinose e (3) sacarose.

### 3.3 – Produtos da soja

A soja está presente diariamente em nossas vidas sob a forma dos mais diversos alimentos tais como: margarinas, óleos vegetais, proteínas (texturizada, concentrada, isolada, leite), lectinas, farinhas, farelos, entre outros.

A lectina é largamente utilizada em produtos alimentícios, principalmente em instantâneos como emulsificante. Também é usada em pães, massas, biscoitos e tintas. Suas principais funções são: emulsificantes, aglomerante, desmoldante, estabilizante, anti-espumante, antioxidante e dispersante (MACHADO, 1999).

A fração protéica da soja é utilizada principalmente na fabricação de ração para alimentação animal. A forma mais utilizada na produção animal é como farelo, resultante da extração do óleo, sendo também largamente empregado pelas indústrias de ração (LIMA & ANGNES, 1999). No Brasil, o óleo de soja representa acima de 50% de todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999). A fração de óleos é utilizada também na indústria de alimentos para produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos. Aproximadamente 83% da soja produzida no mundo é utilizada para extração de óleo, que é destinado, principalmente, ao consumo humano, sendo o farelo resultante utilizado na fabricação de ração animal (LIMA & ANGNES, 1999).

Os produtos protéicos de soja se enquadram em três categorias básicas: farinha com cerca de 50 % de proteínas, concentrados protéicos (70 %) e isolados protéicos de soja (90-97%). Eles podem ser processados em produtos texturizados de soja, sendo utilizados em panificadoras como clarificadores de farinhas e agentes de melhoria das características de

panificação e conservação (MOREIRA, 1999). A farinha integral apresenta composição muito semelhante à soja integral. O valor nutritivo da proteína das farinhas integrais é de 80-90 % do valor da caseína. A farinha de soja desengordurada e “grits” de soja têm sido as principais formas de utilização das proteínas de soja na indústria de alimentos. Já o concentrado protéico de soja é obtido submetendo-se a farinha desengordurada de soja a vários processos de extração, os quais removem componentes solúveis como a sacarose, rafinose, estaquiose, minerais e outros, elevando o conteúdo de proteína até 70 % ou mais. A eficiência nutritiva da proteína é a mesma que a da farinha, enquanto a solubilidade da proteína reduz devido à desnaturação pela ação do álcool ou calor. O isolado protéico de soja deve conter acima de 95 % de proteínas e apresentar um valor protéico superior ao da farinha ou do concentrado protéico de soja (SGAEBIERI, 1996).

O leite de soja ou extrato hidrossolúvel é um produto protéico de soja que pode ser comparável ao leite de vaca em conteúdo de proteínas e gorduras, tendo obtido alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (MOREIRA, 1999). De acordo com Desjardins et al. (1990), o leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados. O leite de soja é uma alternativa para as pessoas portadoras de certas intolerâncias ao leite de origem animal e de algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (DE LUMEN, 1992).

### **3.4 – Processamento da soja**

O tipo de processamento é de importância extrema quando se usa soja para alimentação animal. O subprocessamento deixa inibidores de tripsina residuais e outros componentes antinutricionais que afetam a capacidade do humano ou animal para digerir ou absorver alimentos (CAMPOS, 2006).

Um processamento adequado é essencial para desnaturar fatores antinutricionais (que interferem com a digestão de proteína e com absorção de nutrientes) e, também, para ampliar a disponibilidade de óleo (CAMPOS, 2006).

A soja recebida nas indústrias processadoras é classificada de acordo com sua umidade e impurezas. Após a classificação a soja passa por uma limpeza para a retirada dos materiais grosseiros; realizada a limpeza, seca-se o grão a fim de reduzir a sua umidade ao nível de 12 %, sendo em seguida armazenada em silos, que mantém a umidade adequada do grão (BARTOLOMAI, 1987).

Em seguida ocorre a preparação das sementes, essa etapa consiste em um conjunto de operações apropriadas (quebra do grão, separação da casca, trituração, laminação e em alguns casos extrusão). Todas estas etapas são aplicadas a fim de aumentar a superfície de contato do grão para a próxima etapa, a extração.

A extração é a etapa em que se obtêm o óleo de soja. Este é obtido industrialmente por extração por solvente em contracorrente ou mecanicamente por prensagem. A extração por solvente, desde seu surgimento, mostrou-se o modo mais interessante de se extrair óleos vegetais de suas matrizes. O sucesso do processo a solvente está em sua capacidade de reduzir a níveis bastante baixos o resíduo de óleo presente em materiais oleaginosos. Os solventes mais usados são os derivados de petróleo e, erroneamente, diz-se que o solvente mais adequado para a extração é o hexano. Embora possa se extrair óleo de soja com hexano, o que é usado na realidade é a hexana, uma mistura de solventes orgânicos composta de: n-hexano, ciclohexano, metil-ciclopentano, 2-metilpentano e outros (RECH et al., 1998).

A extração consiste em colocar a matéria-prima em contato com um solvente que tem afinidade com o óleo. A mistura de solvente e óleo, chamada de micela, é separada por evaporação do farelo desengordurado, que será utilizado posteriormente na extração de proteína. O óleo bruto pode ser refinado e vendido como óleo vegetal, ou hidrogenado para a produção de margarina. O farelo resultante da extração é seco para remoção do solvente residual, sendo obtido depois de algum processamento produtos como: farinha integral pré-cozida, farinha desengordurada, proteína concentrada, proteína isolada, proteína texturizada, extrato hidrossolúvel em pó e hidrolisados (PARAISO, 2001)

Uma etapa intermediária é executada com a adição de água ao óleo para a remoção de fosfatídeos (lectinas). Onde ocorre a formação de uma goma, insolúvel na fase oleosa, que é separada com o uso de centrífugas. Embora se use no processo de extração hidrocarbonetos, é importante ressaltar que a extração pode ser executada com outros solventes como etanol (SILVA & TURATTI, 1991).

A farinha desengordurada de soja é usada para a obtenção das proteínas de soja (texturizada, concentrada, isolada). A proteína texturizada é obtida fazendo-se a extrusão da farinha desengordurada, sendo que esta ainda pode ser modificada para atender os mais diversos fins. A proteína concentrada é obtida pela lavagem da farinha desengordurada com ácidos fracos em pH 4,5, contendo até 70 % de proteína. A fase insolúvel (proteínas e fibras) é separada do soro ácido por filtração ou centrifugação e secada, o soro ácido é tratado como efluente industrial. Para a obtenção da proteína isolada de soja, a farinha desengordurada é dissolvida em pH básico, filtrada ou centrifugada (retirando-se as fibras) e re-acidificada até o

pH 4,5, ocorrendo a precipitação da proteína. Este coalho protéico pode ser seco por atomização (*spray-drier*), ou sofre texturização (POTTER & HOTCHKISS, 1997). O soro ácido com açúcares da soja muito diluídos é tratado como efluente industrial. A principal diferença entre isolados e concentrados é que a proteína concentrada apresenta fibras, já que a farinha desengordurada é diretamente dissolvida em água e precipitada. Outra opção é a transformação das proteínas por enzimas como pancreatina (HETTIARACHCHT & KALAPATHY, 1997). A Figura 3.3 ilustra o processamento da soja descrito anteriormente.

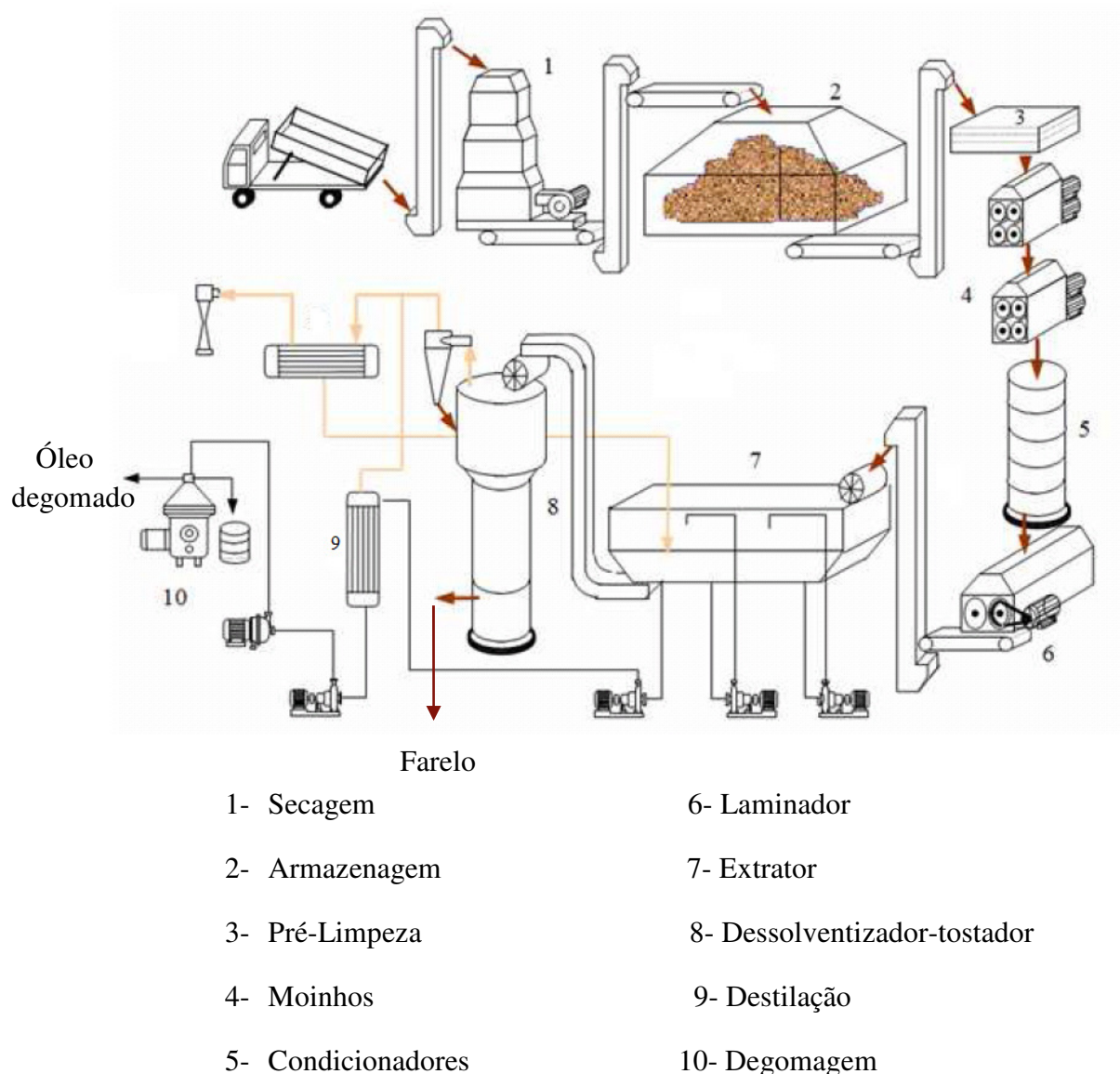


**Figura 3.3** – Fluxograma do processo de obtenção do óleo degomado e do farelo de soja (adaptado de Fernandes Júnior, 2009)

### 3.5 – Melaço de soja

Segundo Siqueira (2007) para cada tonelada de soja processada obtém-se 716 kg de farelo, sendo este utilizado para a obtenção de concentrados protéicos; 156,07 kg de melaço de soja são gerados. A Figura 3.4 mostra o balanço de massa para o processamento da soja.

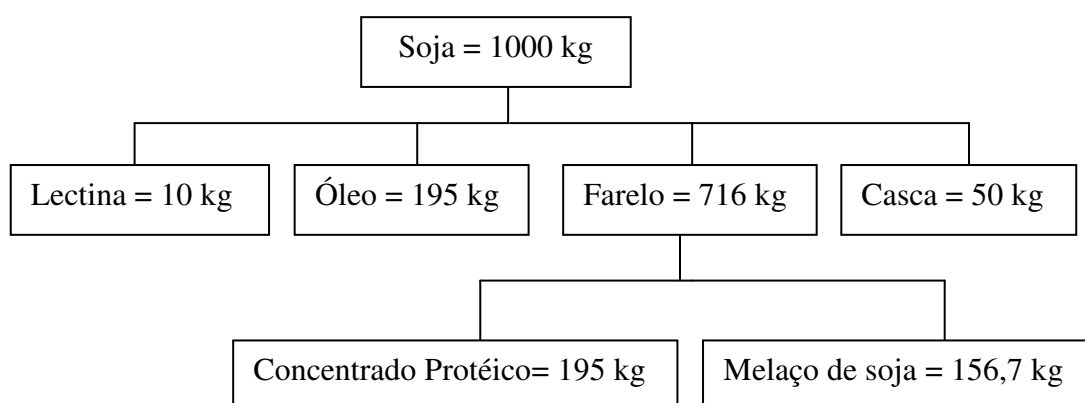


**Figura 3.4** – Fluxograma do balanço de massa para processamento da soja. (adaptado Siqueira, 2007)

A obtenção do extrato protéico é tradicionalmente feita com base no ponto isoelétrico das proteínas da soja que se situa na faixa de pH 4,0 – 5,0 e pode ser alcançado com o uso de ácidos ou bases. Outra maneira de extrair as proteínas da soja é com o uso de uma mistura de etanol e água. Esta mistura insolubiliza as proteínas e fibras da soja que são retiradas após secagem obtendo um produto conhecido como proteína concentrada de soja. A fração líquida da mistura etanol e água contém na sua maior parte os açúcares da soja, que após a recuperação do etanol por evaporação gera o melaço de soja (MACHADO, 1999).

A eletroacidificação também é usada para a obtenção de isolados. Esta técnica consiste em atingir o ponto isoelétrico da proteína da soja por meio dos íons  $H^+$  e  $OH^-$  provenientes da dissociação da água. Este método traz consigo a vantagem de não gerar resíduos de ácido e base (BAZINET et al., 1997). Além disso, não há desnaturação de proteínas como no método tradicional.

O processo de extração com etanol pode ser usado para obtenção de concentrados protéicos. O processo consiste na diluição do farelo desengordurado em uma solução 60 % etanol mais 40 % água. Por extração são separadas duas frações, uma composta por um concentrado alcoólico insolúvel contendo 66-70 % de proteína e outra líquida contendo principalmente açúcares. A fração líquida é destilada para a recuperação do solvente restando o chamado melaço de soja, que é o único resíduo do processo de extração de proteína com

etanol. O concentrado alcoólico é comercializado seco, obtendo-se assim proteína concentrada em pó. A Figura 3.5 ilustra o processo de obtenção do melaço de soja.

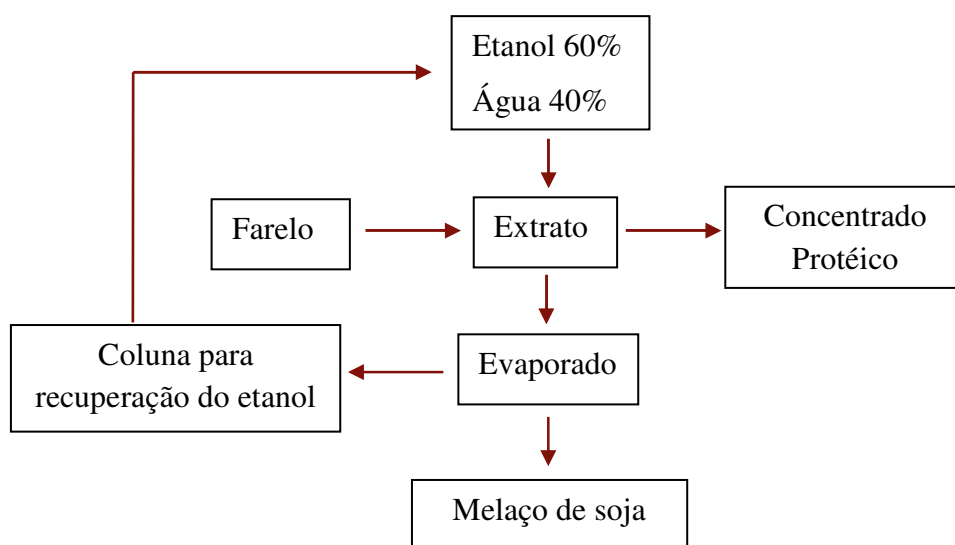


**Figura 3.5** – Fluxograma obtenção do melaço de soja (adaptado de Siqueira, 2007).

A Tabela 3.3 mostra a composição do melaço de soja.

**Tabela 3.3** – Composição do melaço de soja.

| Componentes | % massa seca |
|-------------|--------------|
| Glicose     | 0,243        |
| Frutose     | 0,127        |
| Galactose   | 0,254        |
| Sacarose    | 28,4         |
| Rafinose    | 9,68         |
| Estaquiose  | 18,6         |
| Proteínas   | 9,44         |
| Lipídeos    | 21,2         |
| Fibras      | 5,7          |
| Cinzas      | 6,36         |

Fonte: SIQUEIRA (2007)

### 3.6 – Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ( $1 < \text{pH} < 2$ ;  $100 < \text{Temp.} < 150^{\circ}\text{C}$ ). Devido às suas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e na cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de sub-produtos indesejáveis e desnaturação de proteínas (SANTIAGO, 2002).

#### 3.6.1 – Processo com ácido concentrado

A aplicação do processo com ácido sulfúrico concentrado foi extensivamente estudado antes e depois da 2ª guerra mundial, e aplicações práticas foram realizadas nos Estados Unidos, Itália e Japão. Um processo chamado *Peoria* foi desenvolvido por *Northern Regional Research Laboratory* em Illinois, e outro processo chamado de *Jordany-Reon* foi desenvolvido em Bozen, Itália. Um processo diferente também foi desenvolvido no Japão com a ajuda do governo, em 1948, e foi chamado de *Hokkaido*. Uma planta industrial usando este processo foi construída em Asahikawa, Hokkaido, em 1963, com uma capacidade de 100 toneladas de madeira seca por dia. Entretanto, a planta foi forçada a parar a operação após um ano, devido principalmente a circunstâncias econômicas (HON, 1991; RODRIGUES, 2007).

A hidrólise ácida concentrada é realizada em baixas temperaturas, por exemplo,  $40^{\circ}\text{C}$ , e fornece rendimentos elevados de açúcar, por exemplo, 90% da produção de glicose teórica. No entanto, o consumo de ácido é alto, muita energia é consumida para a recuperação e reciclagem do ácido, o equipamento pode sofrer corrosão, e o tempo de reação necessário é de 2-6 h (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; RODRIGUES, 2007).

#### 3.6.2 – Processo com ácido diluído

O primeiro processo prático, *The Scholler-Tornesch*, foi desenvolvido na Alemanha em 1930. Foi modificado nos Estados Unidos como processo *Madison e Tennessee Valley Authority* (TVA), e foi introduzido na Suíça, Alemanha e Japão. Entretanto, após a segunda guerra mundial, o processo foi usado somente na ex- União Soviética e em alguns países socialistas (HON, 1991).

A hidrólise ácida diluída é interessante, pois a corrosão das partes metálicas durante o processo deve ser menor que na hidrólise ácida concentrada. É adequada para a operação em larga escala (HON, 1991).

A hidrólise ácida diluída é caracterizada por um baixo consumo de ácido, tempos curto de reação a elevadas temperaturas de processo. Hemicelulose é geralmente muito mais suscetível a hidrólise ácida do que a celulose, rendimentos de mais de 85% podem ser obtidos em condições relativamente suaves, mas apenas uma pequena parte da celulose é convertida em glicose (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

### 3.7 – Histórico da fermentação alcoólica

A saga pelo desenvolvimento de energia alternativa começou nos anos 70 com a implantação do primeiro programa de produção em larga escala de combustível renovável, o Proálcool (Programa Nacional do Alcool). Três principais fatores foram determinantes na implementação desse programa no Brasil. O primeiro fator foi a brusca elevação no valor do barril de petróleo que saltou de US\$ 2,5 em 1973 para US\$ 20,00 em 1979 e alcançando a incrível marca de US\$ 34,40 em 1981 (ZANIN *et al.*, 2000). O segundo fator foi que o programa capacitou o Brasil a uma dependência muito menor de energia importada na forma de óleo cru. Em 1973 o país importava cerca de 34% de petróleo, já após a implantação do Proálcool esse número caiu para 18% em 1986 (ZANIN *et al.*, 2000). E o terceiro e mais importante fator foi a queda internacional no preço do açúcar, que passou de US\$ 1400 a tonelada métrica em novembro de 1974 para US\$ 268 em dezembro de 1975, levando os usineiros da época à busca por uma solução economicamente mais satisfatória junto ao governo federal (ZANIN *et al.*, 2000).

Em dez anos foram investidos 16 bilhões de dólares em pesquisas genéticas para melhoria da cana-de-açúcar, subsídios ao preço do álcool e compra de novas máquinas agrícolas com financiamento a juros baixos. Em 1985, com a queda no preço do petróleo no mercado internacional, o governo não conseguiu manter os subsídios. Em 1989, houve desabastecimento, e os brasileiros que tinham carros a álcool ficaram reticentes (GUANDALINI & SILVA, 2006).

Em 2002 a situação volta a ser favorável à produção do etanol. Segundo Ferreira (2002) estudos mostram que o setor correspondeu positivamente aos estímulos externos, tanto os governamentais, escassos, como os provenientes do mercado de combustíveis. Esses

estudos ainda relatam a disponibilidade de espaço para o aumento da produtividade da lavoura e da indústria que poderá fazer baixar ainda mais o custo.

### **3.8 – Processos fermentativos**

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001). Na produção industrial de etanol em grande escala, os processos fermentativos se classificam em processos em batelada e contínuos, sendo que a denominação batelada na prática industrial da produção de etanol se refere à batelada alimentada.

Segundo Almeida (1960), surgiu na França na década de trinta o processo Melle-Boinot (batelada alimentada) que proporcionou um grande avanço na produção industrial de etanol.

Os processos de corte e clássicos (pé-de-cuba) eram muito utilizados até a década de sessenta no Brasil. Após essa época, os processos de batelada alimentada começaram a ser implantados (ANDRIETTA, 2004).

#### **3.8.1 – Batelada**

Trata-se de um processo de fermentação alcoólica descontínuo, que utiliza um inóculo novo a cada batelada. Segundo Maiorella et al. (1981), este processo é muito lento, pois se gasta muito tempo em etapas de limpeza e preparação do reator.

No que se refere à manutenção e assepsia, o processo descontínuo é considerado o mais seguro, pois, ao final de cada batelada, o reator pode ser esterilizado juntamente com um novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deve ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do micro-organismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001). Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e por permitir uma melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do micro-organismo (CARVALHO e SATO, 2001).

#### **3.8.2 – Batelada Alimentada**

O processo batelada alimentada, também conhecido como “Melle-Boinot”, é um processo em que o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume do biorreator. Este processo, apesar de antigo, é muito conveniente e satisfatório quanto à operação e eficiência de conversão de açúcares a álcool (ZARPELON e ANDRIETTA, 1992; CARVALHO e SATO, 2001).

Almeida (1960) descreve as seguintes vantagens do processo Melle-Boinot: Economia de açúcar devido a menor reprodução celular elevando o rendimento em etanol, eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação das células de levedura), fermentação mais pura devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido), eliminação da necessidade de cultura para o preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto, a complexidade das operações da planta.

### 3.8.3 – Processo Contínuo

De uma forma geral, neste tipo de processo não há interrupções, ocorrendo a retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, permitindo um fluxo contínuo, reduzindo assim o efeito inibitório do etanol e do substrato. Segundo Rodrigues et al. (1992) este processo tem apresentado uma maior produtividade, com um aumento que pode atingir 100% em relação à batelada alimentada. Os processos contínuos apresentam as seguintes vantagens frente aos demais processos de produção de etanol: aumentam a produtividade do processo, em virtude de uma redução dos tempos mortos ou não produtivos, obtenção de caldo fermentado uniforme, o que facilita o projeto das operações de recuperação do produto de interesse, *downstream*, manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou, ainda, para estudos de otimização da composição de meio de cultura, possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção, maior facilidade no emprego de controles avançados, menor necessidade no emprego de mão-de-obra, pode ser facilmente instalado em unidades produtoras de etanol convencionais.

Cysewski & Wilke (1978), demonstraram uma redução de 57% no investimento de capital fixo em destilarias com fermentação contínua quando comparada ao daquelas que utilizam processo batelada. Reduções ainda maiores, da ordem de 68 e 71%, são obtidas para os processos que utilizam reciclo de células e operação a vácuo, respectivamente (ANDRIETTA, 2004).

Segundo Andrietta (1994), o processo de fermentação contínua pode ser dividido em três etapas: Unidade de tratamento ácido, unidade de separação de células de levedura e fermentação propriamente dita.

Paiva et al., (1996) demonstraram que é possível diminuir os custos de produção deste combustível operando com um reator de forma contínua, tipo torre, com altas concentrações de células utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características floculantes e ainda obter produtividade de 14,4 g de etanol/L. Em relação à batelada alimentada, esse processo tem apresentado uma maior produtividade, com aumento que pode atingir até 100 % (RODRIGUES et al., 1992).

### 3.9 – Microrganismo da Fermentação Alcoólica

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. Os fungos são organismos não-fotossintéticos que, com algumas raras exceções, possuem parede celular. Eles obtêm seu alimento por absorção e não possuem clorofila. O reino *Fungi* é dividido em três grupos: os fungos limosos, os inferiores flagelados e os fungos terrestres. Existem ainda, quatro grupos de fungos terrestres: os *Zigomicetos*, *Ascomicetos*, *Basidiomicetos* e os *Deuteromicetos*. As leveduras pertencem à classe dos *Ascomicetos*, denominados fungos superiores, por possuírem estrutura consideravelmente mais complexa do que os outros fungos. As *Saccharomyces cerevisiae* estão entre as leveduras mais conhecidas em todo o mundo por serem utilizadas no processo de produção de bebidas alcoólicas, pães e na produção de etanol combustível (PELCZAR Jr., 1997).

As *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas na produção de etanol e apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), em que a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

Como entidade viva independente, a levedura realiza a fermentação dos açúcares com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. As células de levedura possuem compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria (AMORIM et al., 1996)

A primeira descrição das leveduras data de 1680 e foi realizada por Antonie van Leeuwenhoek, observando a cerveja em fermentação. Pasteur, em estudos divulgados a partir

de 1866, provou que a fermentação é fruto da atividade de células vivas, as leveduras, na ausência de oxigênio (MILLER, 1959).

As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas, economicamente, as leveduras ainda são os agentes largamente utilizados (LIMA et al., 2001).

### 3.10 – Bioquímica da Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO<sub>2</sub> (LIMA e MARCONDES, 2002).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação etanólica é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições anaeróbias, o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de CO<sub>2</sub>. A transformação do açúcar (glicose) em etanol e dióxido de carbono envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa.

O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia Adenosina Trifosfato (ATP) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO<sub>2</sub> resultantes constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA, et al., 2001).

O rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g/g para etanol e 0,489 para CO<sub>2</sub> em base mássica, utilizando como substrato uma hexose. Dois ATPs produzidos na glicólise são usados na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas biorreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto. Sem o consumo contínuo de ATP pelo crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente, em razão do acúmulo intracelular de ATP, que

inibe a fosfofrutoquinase, uma das mais importantes enzimas reguladoras da glicólise (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Na prática, segundo Oura (1974), este valor não é observado devido à utilização de parte dos açúcares fermentáveis para a produção de glicerol, álcoois superiores, ácidos, entre outras substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção fisiológica da levedura. A Figura 3.6, mostra um fluxograma simplificado da conversão da glicose a etanol.

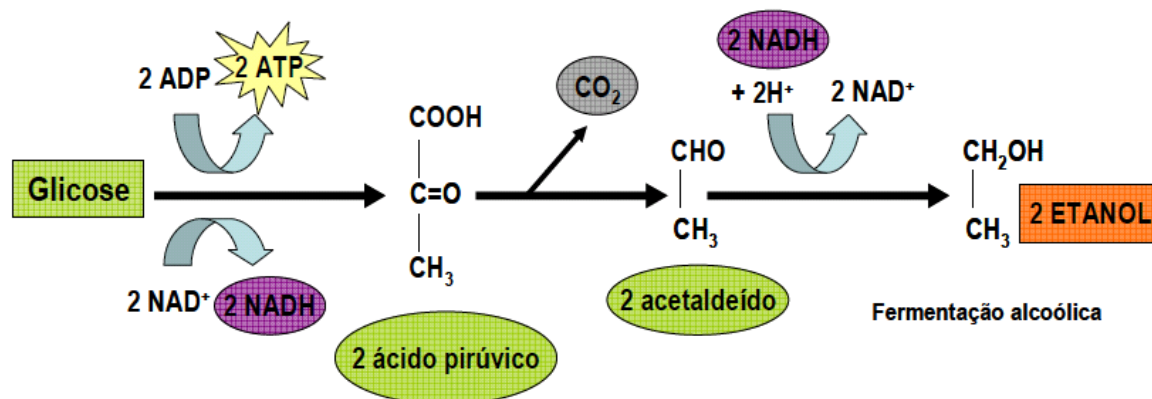


**Figura 3.6** – Fluxograma simplificado da conversão de glicose a etanol. Fonte (GALASSI, 2007)

### 3.11 – Fatores que influenciam na Fermentação Alcoólica

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA et al. 2001).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais frequentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, acidez do meio (inclusive no tratamento ácido que ocorre na assepsia do leite de levedura) (BASSO, 1991).

#### 3.11.1 – Temperatura

A temperatura ótima para a produção industrial de etanol situa-se na faixa de 29 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C. À medida que a

temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (LIMA et al., 2001).

O rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), porém apresentam uma demora para a obtenção da produção máxima. Quando a temperatura do biorreator é de 25°C a 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas maiores que 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA et al., 2003).

### 3.11.2 – pH do meio

As fermentações se desenvolveram numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA et al., 2001).

No processo com reutilização da levedura, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma ou duas horas, visando à redução da carga microbiana. Desta forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA et al., 2001).

Fermentações conduzidas em meios ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de se restringir o crescimento bacteriano. Entretanto, fermentações alcoólicas se desenvolveram bem em níveis mais elevados de pH como em melaços (pH 5,8 a 5,9). Já os caldos de cana fermentam sem correção de acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8 (LIMA et al., 2001).

O processo fermentativo, ocorrendo na faixa mais elevada de pH nas indústrias, acaba beneficiando a integridade fisiológica da levedura em fermentações com altas concentrações de SO<sub>2</sub>, sacarose e etanol (JONES et al., 1981).

A tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais, mesmo assim, a utilização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* resistente ao estresse ácido é uma característica importante para a indústria de álcool combustível (MONACO, 2007). Segundo Gomes (1988), valores baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, aumentam a sensibilidade ao etanol aos ácidos orgânicos e ao SO<sub>2</sub>.

Dorta (2006), no estudo de fatores sinérgicos entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica da levedura, após a análise de todos os parâmetros estressantes, verificou que o mais baixo valor de pH (3,6) foi o que mais interferiu no metabolismo das

linhagens estudadas. Verificou, também, que o pH 4,5 mostrou ser suficiente para minimizar os efeitos danosos do sulfito e etanol sobre a célula.

No pH 4,5 a ação deletéria do sulfito é minimizada pelo fato deste se apresentar em sua forma menos tóxica. O bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) em pH 4,5 está predominantemente na forma de bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), não sendo a forma mais tóxica para a levedura quanto à de  $\text{SO}_2$ . O pH mais elevado ocasiona menos entrada no interior das células de ácidos orgânicos,  $\text{SO}_2$  e um menor efeito tóxico associado à presença do etanol (CARTWRIGHT et al., 1989).

### 3.11.3 – Presença de sulfito no meio

O sulfito é um dos componentes do melaço que pode afetar o desenvolvimento da fermentação alcoólica. Desde 1990, o uso de melaço na formulação dos mostos para fermentação alcoólica tem crescido bastante e conseqüentemente a concentração de sulfito no mesmo. O sulfito é normalmente utilizado no processo de clarificação do açúcar e está presente em altas concentrações no melaço de cana-de-açúcar, contribuindo para a diminuição do rendimento alcoólico e viabilidade das células das leveduras (DORTA, 2006).

A sulfitação consiste em um método de tratamento do caldo de cana-de-açúcar de uso generalizado no Brasil e nos países produtores de açúcar branco de consumo direto. Esse método foi introduzido a partir do século XVIII, com o objetivo de remover impurezas que conferem cor e turbidez ao caldo, sendo o dióxido de enxofre o principal reagente utilizado (MAFRA, 2004).

Estudos da toxicidade do sulfito, tanto em laboratório, como a partir de informações coletadas na indústria, mostram que a sua presença no meio de fermentação (em até cerca de 100 ppm), traz mais benefícios (redução da contaminação bacteriana) do que efeitos tóxicos à levedura (BASSO, 1991).

Alves (1994) chegou à conclusão de que a presença de sulfito no mosto fermentativo pode ser benéfica se este atuar como bactericida, pois a contaminação bacteriana causa maiores danos ao processo que a diminuição do rendimento causado pelo sulfito.

Oliva-Neto e Yokoya (2001) concluíram que a CMI (Concentração Mínima Inibitória) para o sulfito de sódio, em pH 4,5, se dá na faixa de 10-40mg/mL para bactérias lácticas (principais bactérias contaminantes da fermentação alcoólica), já para a levedura o CMI foi de 50.000 mg/mL, nas mesmas condições.

O enxofre na forma de sulfito, quando está acima do nível ideal (principalmente no caso de uso do melaço como matéria-prima), aumenta a produção de glicerol e inibe o

desenvolvimento das leveduras que, com o passar do tempo, passam a apresentar certa adaptação a tal situação (AMORIM, 2005).

Anacleto e Van Uden (1982) estudaram a cinética de morte celular em função da elevação da concentração do sulfito e da temperatura. Eles concluíram que o efeito de morte em *Saccharomyces cerevisiae* foi dependente do pH e correlacionado com a concentração de dióxido de enxofre em suspensão no meio.

Segundo Amaral (2009) o efeito da concentração de sulfito está intimamente ligado ao pH do meio e que maiores concentrações de sulfito implicam em menor produtividade de etanol quando comparado com o meio sem sulfito.

#### 3.11.4 – Presença de ácidos orgânicos no meio

Os compostos fenólicos podem agir como inibidores dos micro-organismos, dependendo da concentração (O'CONNOR & RUBINO, 1991). Conforme Narendranath et al. (2001), os ácidos orgânicos também são potenciais inibidores das leveduras.

Estes compostos estão presentes nas plantas da cana-de-açúcar e acabam se acumulando nos méis que posteriormente serão fermentados. Este acúmulo acontece quando o caldo passa pelos evaporadores e cozedores para a retirada da água e cristalização do açúcar, mas à temperatura que o caldo é submetido não é suficiente para evaporar ou decompor estes compostos que possuem elevados ponto de ebulição e boa estabilidade térmica. Durante o cozimento, pode ocorrer também a degradação térmica da sacarose, formando compostos indesejáveis à fermentação alcoólica, tais como ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico, fórmico e acético) e hidroximetilfurfural (HMF). Estes compostos, por apresentarem ação antimicrobiana, podem afetar o desempenho das leveduras, podendo ser uma das causas da baixa qualidade fermentativa de alguns méis. Na presença de temperaturas elevadas, ocorrem duas transformações químicas envolvendo os carboidratos, sendo elas a reação de Maillard com degradação de Strecker e a caramelização, ocorrendo a degradação do carboidrato e formando compostos voláteis. As reações de Maillard podem produzir compostos como o acetaldeído, o benzaldeído, o formol e o aldeído láctico. A caramelização pode produzir ácido fórmico, acético, hidroximetilfurfural, entre outros (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

Segundo DE BRUIJN et al. (1986), os monossacarídeos são degradados em meio alcalino a ácidos carboxílicos. A maior parte dos monossacarídeos é convertida em ácidos carboxílicos de baixo peso molecular com o mesmo ou menor número de carbonos. Alguns exemplos destes ácidos: láctico, fórmico, acético, glicólico, sacarínico.

---

## CAPÍTULO 4

### MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 4.1 - Micro-organismo

Utilizou-se uma cepa de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y904, adquirida da Mauri Brasil Ind. Com. Ltda.

#### 4.2 – Matéria prima: Fonte de carbono

O substrato utilizado na fermentação para produção de etanol foi obtido a partir de um resíduo gerado do processo de extração protéica da soja, denominado melaço de soja, cedido pela empresa de processamento de soja Selecta – Araguari –MG. A amostra cedida para os estudos foi colocada em recipientes de 2 litros, os quais foram armazenados em freezer horizontal (Electrolux, modelo H300) para utilização durante todo o desenvolvimento dos experimentos. Para evitar possíveis variações na composição do substrato, a mesma amostra foi utilizada durante a realização de todos os experimentos.

#### 4.3 – Ácidos utilizados na hidrólise

Para a hidrólise do melaço de soja testou-se três tipos de ácidos: ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) P.A. Isotar, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) P.A. Vetec e o ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) P.A. Vetec.

#### 4.4 – Testes Preliminares

Testes preliminares foram realizados com os três ácidos citados para definir a diluição do melaço a ser usada, o tempo de hidrólise e o tempo de fermentação que promovessem o maior rendimento de etanol para cada ácido estudado.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers com volume útil de 100 mL, sendo a temperatura e a agitação controladas no *shaker*. No primeiro teste variou-se a diluição e o tempo de hidrólise do melaço. As condições testadas foram:

- Diluição 1:2; 1:3 e 1:4 ( $\text{g}_{\text{melaço}}/\text{g}_{\text{meio}}$ )
- Tempo de hidrólise 10; 20; 30 e 40 min

No teste de diluição e tempo de hidrólise os ensaios foram conduzidos nas seguintes condições: na hidrólise adicionou-se solução de ácido diluído até que o pH do meio atingisse o valor de 3, os erlenmeyers tampados contendo amostras do melaço de soja e a solução de ácido foram conduzidos a uma autoclave a uma pressão absoluta de 1,5 atm. Na fermentação realizada após a hidrólise ácida do melaço utilizou-se: temperatura de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , pH ajustado para 4,5, velocidade de agitação de 130 rpm nos testes realizados em *shaker*, tempo de 12 h e concentração de micro-organismos de  $30 \pm 0,2$  g/L sendo que o volume de inóculo foi de 30% do volume total do meio; sendo que o inóculo consistia da hidratação da levedura sob agitação por duas horas.

Definidos a melhor diluição de melaço e o melhor tempo, realizou-se uma cinética para cada ácido com intuito de avaliar o tempo de fermentação. As condições da hidrólise e da fermentação foram as mesmas usadas para o teste de diluição, sendo que o tempo e a diluição usados foram aqueles que apresentaram melhor rendimento de etanol selecionados através dos resultados para os testes de diluição e tempo realizados anteriormente.

Durante as fermentações dos testes preliminares acompanhou-se o consumo de açúcar total e a produção de etanol sendo que na cinética também foi acompanhada a concentração celular. Definidos a diluição, o tempo de hidrólise e o tempo de fermentação, a próxima etapa foi avaliar a influência das variáveis por meio de um planejamento experimental.

#### 4.5 – Metodologia Experimental

Os ensaios experimentais foram realizados em batelada, sem suplementação de fontes minerais, sob agitação em um reator (Applikon) com volume útil de 1,5 L. O volume do inóculo correspondeu a 30% do volume total do meio. O volume total de cada fermentação foi 1,5 L, sendo 0,45 L de inóculo. O inóculo consistiu-se da levedura após hidratação em água durante 2 horas, sob agitação. A Figura 4.1 mostra a foto da unidade de trabalho utilizada nos experimentos.



**Figura 4.1** – Unidade utilizada nos experimentos

Cada fermentação foi monitorada por amostragens periódicas do meio fermentativo, para acompanhamento das concentrações de açúcar total (AT), etanol e células. Amostras de 30 mL foram retiradas do reator e centrifugadas por 15 minutos a 12.500 rpm (9800 G). Do sobrenadante foram feitas as análises de concentração de AT e etanol. Para avaliar a concentração celular (item 4.6) retirava-se amostra de 1 mL do reator, não sendo necessária a etapa de centrifugação.

Para análise da interação entre as variáveis de entrada e o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas obtidas utilizou-se a técnica do planejamento experimental, com o qual foi feita a otimização por análise da superfície de resposta. Os experimentos foram realizados com auxílio do planejamento fatorial (PF).

#### **4.5.1 - Planejamento experimental fatorial $3^2$**

Com o propósito de obter experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um tratamento estatístico dentro de um planejamento fatorial (PF) para selecionar o ácido usado na hidrólise e verificar tendência de alguma variável do processo para a produção de etanol. Adotou-se um teste de hipótese *t-Student* com área de rejeição de 5%.

O PF realizado foi de três níveis com duas variáveis ( $3^2$ ), totalizando 9 experimentos. As variáveis escolhidas para variação no planejamento foram: pressão de hidrólise e pH de hidrólise. Realizou-se um PF para cada tipo de ácido estudado.

As respostas para o planejamento efetuado foram: produção de etanol, rendimento de etanol e concentração de açúcar total residual. Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *Software Statistica 7.1*, da *StatSoft*. Neste planejamento foi estabelecido o nível superior com o sinal +1 das variáveis escolhidas para o planejamento, sendo a pressão absoluta de hidrólise 2 atm e pH 5. O nível inferior das variáveis escolhidas foi representado por -1 sendo a pressão absoluta de hidrólise 1 atm e pH 3. Os valores adotados foram escolhidos conforme revisão da literatura (MACHADO, 1999; SIQUEIRA, 2007). A Tabela 4.1 mostra a matriz de planejamento utilizada. A otimização foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas.

**Tabela. 4.1** – Matriz do planejamento experimental fatorial  $3^2$  com os valores codificados e originais das variáveis

| Exp. | Valor Real (Valor Codificado) |                |
|------|-------------------------------|----------------|
|      | X <sub>1</sub> (atm)          | X <sub>2</sub> |
| 1    | 1 (-1)                        | 3 (-1)         |
| 2    | 1,5 (0)                       | 3 (-1)         |
| 3    | 2 (+1)                        | 3 (-1)         |
| 4    | 1 (-1)                        | 5 (+1)         |
| 5    | 1,5 (0)                       | 5 (+1)         |
| 6    | 2 (+1)                        | 5 (+1)         |
| 7    | 1 (-1)                        | 4 (0)          |
| 8    | 1,5 (0)                       | 4 (0)          |
| 9    | 2 (+1)                        | 4 (0)          |

Experimentos com menor concentração adotou-se -1 e com a maior concentração +1.

X<sub>1</sub> – pressão absoluta de hidrólise.

X<sub>2</sub> – pH de hidrólise.

Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) pela utilização da Equação 4.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (4.1)$$

$X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1, 2, \dots$ )

$X$  = valor da variável a ser calculada;

$X_0$  = valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = valor da variável no nível inferior.

As Equações codificadas (4.2 e 4.3) são as equações para cada variável estudada no experimento:

$$X_1 = \frac{(\text{pressão absoluta hidrólise} - 1,5)}{\left[ \frac{2-1}{2} \right]} = \frac{(\text{pressão absoluta hidrólise} - 1,5)}{[0,5]} \quad (4.2)$$

$$X_2 = \frac{(\text{pH} - 4)}{\left[ \frac{5-3}{2} \right]} = (\text{pH} - 4) \quad (4.3)$$

Nos experimentos, em que a pressão absoluta de hidrólise é igual a 1 atm, a hidrólise do melaço foi realizada a uma temperatura de 80°C em um banho termostático por um tempo de 60 min. Para os outros experimentos a hidrólise do melaço foi conduzida na autoclave.

Todos os experimentos foram conduzidos a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , com pH 4,5 na fermentação, velocidade de agitação de 230 rpm e com a concentração de micro-organismos inicial para a fermentação de aproximadamente  $30 \pm 0,2$  g/L. A Equação 4.4 mostra o modelo empírico de 2ª ordem que representa cada uma das respostas estudadas.

$$\text{Resposta} = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 \quad (4.4)$$

Sendo:

$\beta_0$  = valor médio da resposta;

a, b, c e d = parâmetro da equação;

$X_1$  = Pressão absoluta de hidrólise;

$X_2$  = pH de hidrólise.

#### 4.5.2 – Avaliação da concentração de inóculo

Verificada a influência do pH e da pressão e escolhido o ácido que apresentou melhor rendimento de etanol estudou-se a influência da concentração de levedura na fermentação do hidrolisado ácido do melaço de soja. As concentrações de micro-organismo testadas foram 25, 30, 35, 40 e 45 g/L de levedura sendo mantido o volume de inóculo na quantidade de 30% do volume total de meio; variou-se somente a concentração de microrganismo no inóculo e não o volume de inóculo. A hidrólise e a fermentação foram realizadas nos pontos ótimos definidos pelos experimentos anteriores, sendo que para a pressão utilizou-se a pressão de 1,5 atm.

#### 4.5.3 – Cinética para avaliar a melhor condição definida

Um estudo cinético foi realizado com o intuito de validar as condições ótimas definidas. A fermentação foi realizada empregando as variáveis independentes pressão absoluta de hidrólise e pH de hidrólise na faixa de maximização das respostas obtidas no PF do item 4.5.1.

A cinética foi realizada no reator apresentado na Figura 4.2 a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , volume útil do reator 1,5 L, velocidade de agitação de 230 rpm. Alíquotas de 30 mL foram retiradas de duas em duas horas para análise da concentração de álcool, açúcar total residual e concentração de células até a estabilização da produção de etanol. Os resultados gráficos da cinética foram obtidos com auxílio do *Software Origin Graph 8.0*.

#### 4.5.4 – Extração de etanol utilizando Evaporador Rotativo

Realizou-se um teste para avaliar a utilização de uma menor diluição do substrato, com intuito de reduzir o consumo de água e o gasto energético. O teste consistia da realização de uma fermentação do hidrolisado ácido do melaço de soja com uma diluição de 500  $\text{g}_{\text{melaço}}/\text{L}_{\text{meio}}$ , o tempo de fermentação e as condições de hidrólise foram realizadas nos pontos ótimos definidos pelos experimentos anteriores. O volume útil de fermentação foi de 1,5 L

sendo 0,45 L de inóculo e o restante de hidrolisado ácido do melaço de soja. Realizada a fermentação, centrifugava-se o fermentado para retirar a levedura e posteriormente o sobrenadante era colocado em um evaporador rotativo (Fisatom), mostrado na Figura 4.2, a uma temperatura de 90° C, por duas horas, para retirar o etanol produzido. Após a retirada do etanol realizava-se outra fermentação, nas mesmas condições, com o caldo resultante com a finalidade de obter um rendimento maior de etanol.



**Figura 4.2** – Evaporador Rotativo (FISATOM, 2011)

#### **4.6 – Determinação do crescimento celular**

Para determinação da concentração celular das amostras utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Olympus). A câmara possuiu 25 quadrículos, considerou-se para contagem 5 quadrículos que possuem 16 retículos com uma área de 0,0025 mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,1 mm para cada quadrícula. Com isso tem-se um volume total da câmara de 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µL (Figura 4.3).

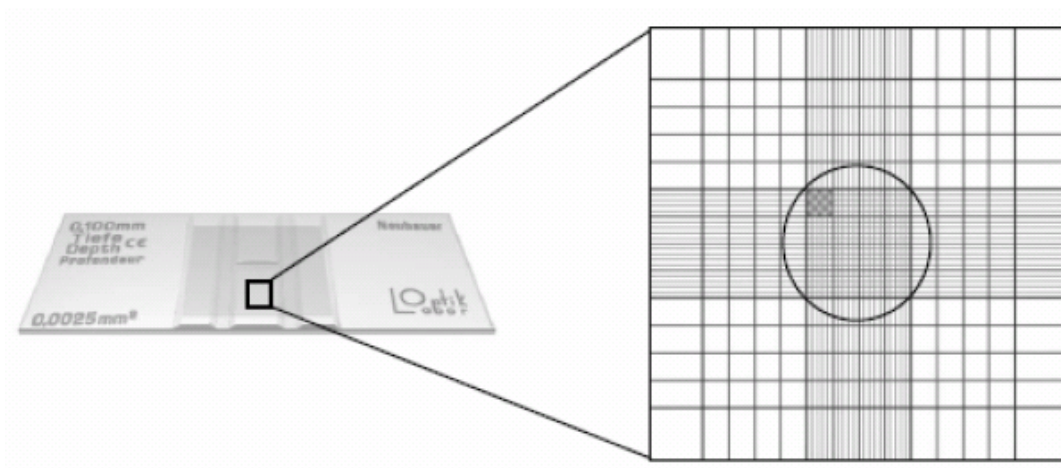


**Figura 4.3** – Câmara de Neubauer (BARGA, 2007).

Para a contagem das células, diluiu-se a amostra e promoveu-se a homogeneização com uma vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. Realizou-se a contagem das células em microscópio óptico utilizando-se um aumento de 100 vezes. O cálculo da concentração de célula foi realizado de acordo com a Equação 4.5 (MADIGAN et al., 2004).

$$\text{células (células/mL)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células totais} \times \frac{1}{\text{volume do retículo}} \times \text{diluição}}{\text{n}^{\circ} \text{ retículos}} \times 1000 \quad (4.5)$$

#### 4.7 – Determinação do açúcar total

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método de cromatografia de alta eficiência. O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária.

A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, o fluxo de bomba 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros. Os valores obtidos foram calculados com o auxílio de uma curva padrão (Apêndice A).

#### 4.8 – Determinação de Etanol

A dosagem de etanol foi feita pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio. Esse método se baseia na oxidação de uma mistura hidroalcoólica a ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro (STECKELBERG, 2001).

Para a utilização deste método, é necessário que o álcool produzido esteja destilado. Para isto, colocava-se 25 mL do sobrenadante e 50 mL de água destilada em um balão volumétrico para destilação, que era interrompida quando eram recolhidos aproximadamente 50 mL de destilado em um erlenmeyer. Este era então diluído na proporção de 1:25. Transferia-se 5 mL do destilado diluído para um tubo de ensaio e adicionava-se 2 mL de água destilada e 2 mL do reagente de cor. O tubo foi tampado e colocado por 30 minutos em banho-maria a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , resfriado à temperatura ambiente, e, em seguida, o valor de absorvância era lido em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos eram substituídos em uma curva padrão (Apêndice A). Utilizou-se água destilada ao invés da solução destilada diluída para confecção do branco.

#### 4.9 – Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcar total inicial ( $AT_i$ ) e por grama de açúcar total consumido ao final da fermentação, considerando o rendimento teórico de  $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$  como 100%, foi determinado pelas Equações 4.6 e 4.7, respectivamente.

$$Y'_{P/S0} = \frac{CE}{AT_i \times 0,511} \times 100 \quad (4.6)$$

$$Y_{P/S} = \frac{CE}{(AT_i - AT_f) \times 0,511} \times 100 \quad (4.7)$$

Em que:

$Y'_{P/S0}$  = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais iniciais (%);

$Y_{P/S}$  = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%);

CE = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

AT<sub>I</sub> = concentração de açúcar total inicial (g/L);

AT<sub>F</sub> = concentração de açúcar total residual (g/L).

#### **4.10 – Produtividade**

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. Ao final da fermentação, a produtividade foi calculada pela Equação 4.10.

$$P_{\text{e tan ol}} = \frac{CE}{t} \quad (4.10)$$

Em que:

P<sub>etanol</sub> = produtividade do etanol (g/ L.h);

CE = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

*t* = tempo de fermentação (h)

---

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

#### 5.1 – Testes preliminares

Os resultados obtidos nos experimentos realizados para verificar a melhor diluição e o tempo de hidrólise para os ácidos sulfúrico, clorídrico e nítrico estão representados nas Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 respectivamente.

**Tabela – 5.1** Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

| Tempo (min) | Diluição (g/g) | AT <sub>I</sub> | CE (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>P/S</sub> | Y' <sub>P/S0</sub> |
|-------------|----------------|-----------------|----------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 10          | 1:4            | 156,1           | 19,40    | 87,60                 | 55,4             | 24,3               |
| 10          | 1:3            | 207,2           | 23,90    | 117,90                | 52,4             | 22,6               |
| 10          | 1:2            | 306,6           | 27,20    | 193,90                | 47,2             | 17,4               |
| 20          | 1:4            | 156,1           | 35,80    | 54,80                 | 69,2             | 44,9               |
| 20          | 1:3            | 207,2           | 45,60    | 74,30                 | 67,1             | 43,1               |
| 20          | 1:2            | 306,6           | 55,80    | 145,80                | 67,9             | 35,6               |
| 30          | 1:4            | 156,1           | 35,70    | 55,90                 | 69,7             | 44,8               |
| 30          | 1:3            | 207,2           | 46,40    | 77,1                  | 69,8             | 43,8               |
| 30          | 1:2            | 306,6           | 57,10    | 142,10                | 67,9             | 36,4               |
| 40          | 1:4            | 156,1           | 35,50    | 55,40                 | 69,0             | 44,5               |
| 40          | 1:3            | 207,2           | 45,30    | 75,80                 | 67,5             | 42,8               |
| 40          | 1:2            | 306,6           | 56,90    | 143,90                | 68,4             | 36,3               |

---

CE - Concentração de Etanol ; Y<sub>P/S</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>I</sub> - Açúcar total inicial; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual ; Y'<sub>P/S0</sub> - Rendimento em relação substrato inicial

**Tabela – 5.2** Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando HCl.

| Tempo (min) | Diluição (g/g) | AT <sub>I</sub> | CE (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>P/S</sub> | Y' <sub>P/S0</sub> |
|-------------|----------------|-----------------|----------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 10          | 1:4            | 155,7           | 21,9     | 80,8                  | 57,2             | 27,5               |
| 10          | 1:3            | 206,3           | 25,8     | 113,4                 | 54,3             | 24,4               |
| 10          | 1:2            | 310,2           | 30,4     | 191,2                 | 50,0             | 19,2               |
| 20          | 1:4            | 155,7           | 36,6     | 56,3                  | 72,1             | 46,0               |
| 20          | 1:3            | 206,3           | 47,3     | 77,1                  | 71,6             | 44,9               |
| 20          | 1:2            | 310,2           | 58,2     | 144,8                 | 68,9             | 36,7               |
| 30          | 1:4            | 155,7           | 35,9     | 58,3                  | 72,1             | 45,1               |
| 30          | 1:3            | 206,3           | 46,6     | 79,7                  | 72,0             | 44,2               |
| 30          | 1:2            | 310,2           | 59,3     | 143,3                 | 69,5             | 37,4               |
| 40          | 1:4            | 155,7           | 36,5     | 56,1                  | 71,7             | 45,9               |
| 40          | 1:3            | 206,3           | 46,9     | 76,7                  | 70,8             | 44,5               |
| 40          | 1:2            | 310,2           | 57,9     | 145,2                 | 68,7             | 36,5               |

CE - Concentração de Etanol ; Y<sub>P/S0</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>I</sub> - Açúcar total inicial; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual; Y'<sub>P/S0</sub> - Rendimento em relação substrato inicial

**Tabela – 5.3** Resultados da diluição e tempo de hidrólise empregando HNO<sub>3</sub>.

| Tempo (min) | Diluição (g/g) | AT <sub>I</sub> (g/L) | CE (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>P/S</sub> | Y' <sub>P/S0</sub> |
|-------------|----------------|-----------------------|----------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 10          | 1:4            | 154,2                 | 23,4     | 77,1                  | 59,4             | 29,7               |
| 10          | 1:3            | 205,3                 | 27,9     | 108,9                 | 56,6             | 26,6               |
| 10          | 1:2            | 308,2                 | 32,8     | 181,4                 | 50,6             | 20,8               |
| 20          | 1:4            | 154,2                 | 40,7     | 45,4                  | 73,2             | 51,7               |
| 20          | 1:3            | 205,3                 | 50,9     | 72,5                  | 73,0             | 48,5               |
| 20          | 1:2            | 308,2                 | 60,6     | 135,6                 | 68,7             | 38,5               |
| 30          | 1:4            | 154,2                 | 40,2     | 48,3                  | 74,3             | 51,0               |
| 30          | 1:3            | 205,3                 | 51,7     | 68,3                  | 73,8             | 49,3               |
| 30          | 1:2            | 308,2                 | 59,3     | 140,6                 | 69,2             | 37,7               |
| 40          | 1:4            | 154,2                 | 39,7     | 48,4                  | 73,4             | 50,4               |
| 40          | 1:3            | 205,3                 | 50,9     | 73,5                  | 73,1             | 47,9               |
| 40          | 1:2            | 308,2                 | 60,9     | 135,9                 | 69,2             | 38,7               |

CE - Concentração de Etanol ; Y<sub>P/S</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual ; AT<sub>I</sub> - Açúcar total inicial; Y'<sub>P/S0</sub> - Rendimento em relação substrato inicial

Analisando os resultados das Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3, nota-se que a diluição que apresentou o maior rendimento de etanol foi a diluição 1:4 (g/g) para todos os tempos de hidrólise. Comparando os tempos percebe-se que após 20 min de hidrólise não se obtém um aumento significativo na resposta rendimento de etanol, sendo assim o tempo de hidrólise definido para os ácidos sulfúrico, clorídrico e nítrico foi de 20 min e a diluição 1:4 (g/g).

Segundo Letti (2007) o melaço de soja na concentração de 20 °BRIX apresenta maior produção de etanol comparado à concentração de 30 °BRIX. Uma redução na produção de etanol ocorre com o aumento da concentração do melaço de soja. Essa redução pode estar relacionada à inibição do metabolismo pelo substrato e pela redução da atividade de água no melaço mais concentrado.

Definido o tempo de hidrólise e a diluição do melaço de soja realizou-se, para cada ácido estudado, uma cinética com o intuito de verificar qual o melhor tempo de fermentação. A cinética foi realizada nas seguintes condições de ensaio, pH de hidrólise 3, pressão absoluta de hidrólise 1,5 atm, diluição 1:4 (g/g), tempo de hidrólise 20 min, seguida da fermentação com concentração de inóculo  $30 \text{ g/L} \pm 0,2 \text{ g/L}$ , pH de fermentação 4,5, temperatura de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , agitação de 130 rpm. Alíquotas de 30 mL foram retiradas para análises das respostas concentração de etanol e açúcar total residual a cada duas horas. Vale ressaltar que o estudo cinético foi realizado em 3 etapas: 0 horas à 6 horas, de 6 horas à 12 horas e de 12 horas à 16 horas.

As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3, obtidas pelo *Origin Graph 8.0* mostram as cinéticas de fermentação para o ácido sulfúrico, para o ácido clorídrico e para o ácido nítrico em relação às respostas estudadas.

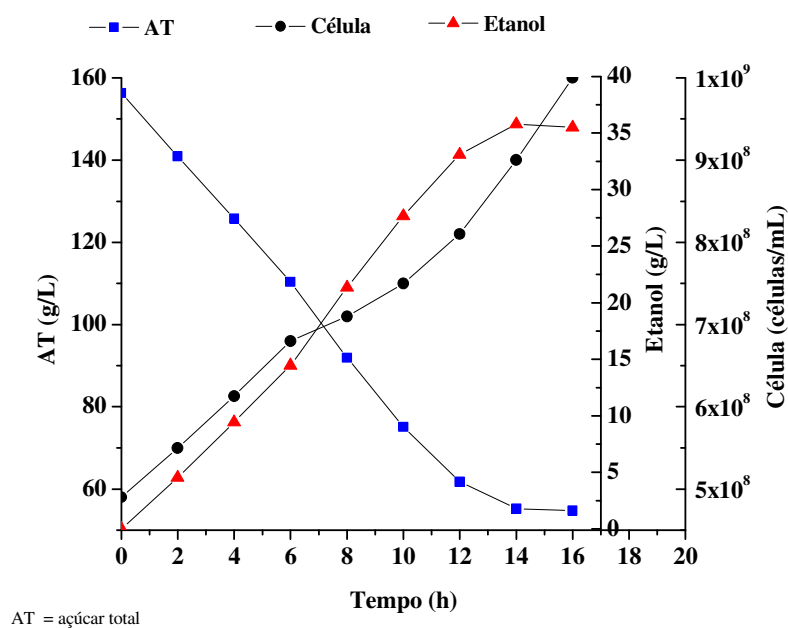


**Figura. 5.1** – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido sulfúrico.

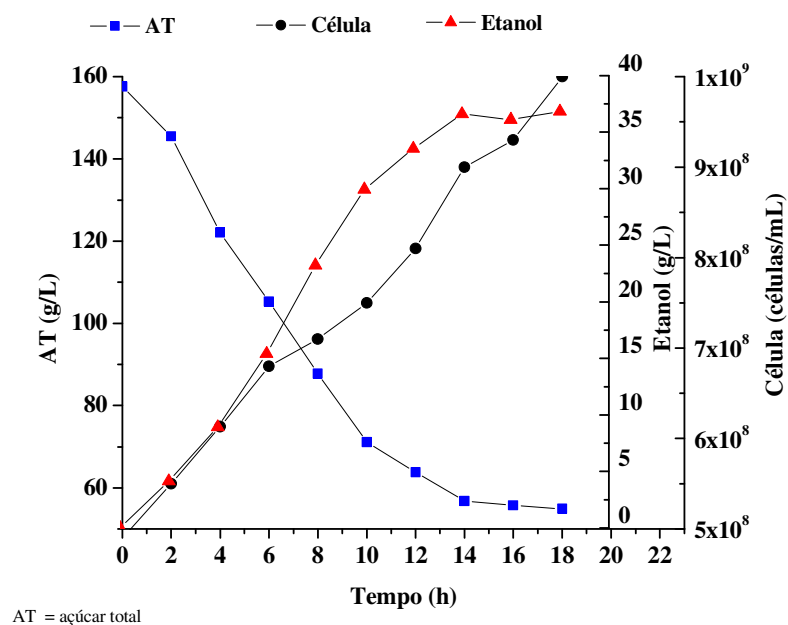


**Figura. 5.2** – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido clorídrico.

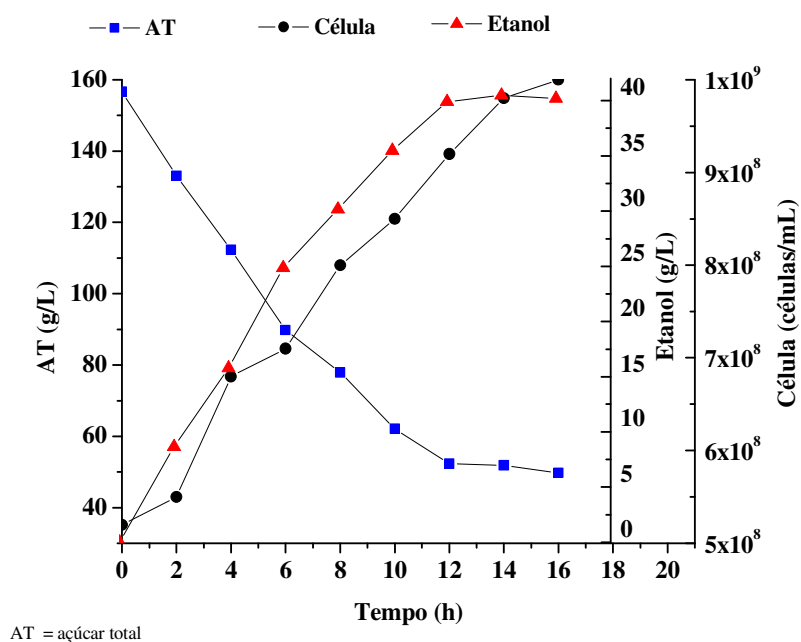


**Figura. 5.3** – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido nítrico.

Nota-se nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 que ocorreu a produção de etanol nos instantes iniciais estabilizando a produção com 12 horas de fermentação para o ácido nítrico e com 14 horas para o ácido clorídrico e para o ácido sulfúrico. Para proporcionar uma maior produção de etanol e para que o micro-organismo não apresentasse um alto crescimento celular, o processo fermentativo foi conduzido com uma concentração celular inicial alta. Sendo assim, observa-se que a levedura não apresentou um elevado crescimento com o tempo.

Definidas as condições: de diluição do melaço (1:4), tempo de hidrólise (20 min) e tempo de fermentação de 12 horas para o ácido nítrico e de 14 horas para os ácidos clorídrico e sulfúrico, realizou-se o planejamento experimental para avaliar a influência do pH e da pressão absoluta de hidrólise.

## 5.2 – Planejamentos experimentais visando a seleção dos ácidos estudados

Foram realizados 3 planejamentos fatoriais, um para cada tipo de ácido. As variáveis analisadas foram pH e pressão absoluta de hidrólise. As respostas avaliadas foram concentração de etanol e rendimento em relação ao substrato consumido e ao substrato inicial.

### 5.2.1 – Planejamento fatorial a 3 níveis para H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

A partir do planejamento fatorial  $3^2$  foi possível verificar como o pH de hidrólise e a pressão absoluta de hidrólise afetam a produção de etanol. Assim, este planejamento foi realizado com a finalidade de selecionar a melhor condição que seria comparada com os outros planejamentos usando diferentes tipos de ácidos. A Tabela 5.4 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas obtidas. Como variáveis foram estudados o pH de hidrólise (pH) e pressão de hidrólise (P). Estas duas variáveis independentes que afetam o desempenho da hidrólise e a concentração de etanol, sendo avaliadas nas faixas: pH (3 a 5) e pressão (1 a 2 atm). E como resposta avaliou-se a concentração de etanol (CE), açúcar total residual ( $AT_F$ ), o rendimento em relação ao açúcar total inicial ( $Y'_{p/s_0}$ ) e o rendimento em relação ao açúcar total consumido ( $Y_{p/s}$ ). A partir desses resultados experimentais pôde-se traçar o perfil de concentração de etanol em função do pH de hidrólise e da pressão absoluta de hidrólise.

Observa-se na Tabela 5.4 que a concentração de açúcar total residual variou de 49,1 g/L (experimento 5) a 90,6 g/L (experimento 7) e a concentração de etanol esteve entre 17,7 g/L (experimento 7) e 39,9 g/L (experimento 5). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo (experimento 5, 10 e 11).

**Tabela 5.4** – Matriz do planejamento experimental fatorial  $3^2$  para  $H_2SO_4$  valor real e codificado.

| Exp.  | $X_1(P)$<br>(atm) | $X_2(pH)$ | $AT_I$<br>(g/L) | $AT_F$<br>(g/L) | CE<br>(g/L) | $Y_{p/s}$ | $Y'_{p/s_0}$ |
|-------|-------------------|-----------|-----------------|-----------------|-------------|-----------|--------------|
| 1     | -1(1)             | -1(3)     | 154,4           | 80,1            | 21,6        | 57,0      | 27,4         |
| 2     | 0(1,5)            | -1(3)     | 154,5           | 59,3            | 35,8        | 73,8      | 45,4         |
| 3     | +1(2)             | -1(3)     | 154,7           | 64,7            | 30,2        | 66,0      | 38,3         |
| 4     | -1(1)             | 0(4)      | 154,0           | 85,2            | 20,4        | 57,9      | 25,9         |
| 5     | 0(1,5)            | 0(4)      | 154,1           | 49,1            | 39,9        | 74,3      | 50,6         |
| 6     | +1(2)             | 0(4)      | 154,5           | 57,6            | 33,7        | 68,3      | 42,8         |
| 7     | -1(1)             | +1(5)     | 153,6           | 90,6            | 17,7        | 54,5      | 22,5         |
| 8     | 0(1,5)            | +1(5)     | 153,7           | 59,3            | 33,3        | 68,7      | 42,3         |
| 9     | +1(2)             | +1(5)     | 153,8           | 64,4            | 30,3        | 66,0      | 38,5         |
| 10(C) | 0(1,5)            | 0(4)      | 154,3           | 48,9            | 40,1        | 74,5      | 50,9         |
| 11(C) | 0(1,5)            | 0(4)      | 154,2           | 48,2            | 40,5        | 74,8      | 51,4         |

CE - Concentração de Etanol ;  $Y_{p/s}$  – Rendimento em relação ao substrato consumido;  $AT_F$  - Açúcar total residual ;  $AT_I$  - Açúcar total inicial;  $Y'_{p/s_0}$  - Rendimento em relação substrato inicial

### 5.2.1.1 Rendimento de etanol

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.4 e considerando que neste planejamento fatorial foi considerada uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta rendimento de etanol, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.4).

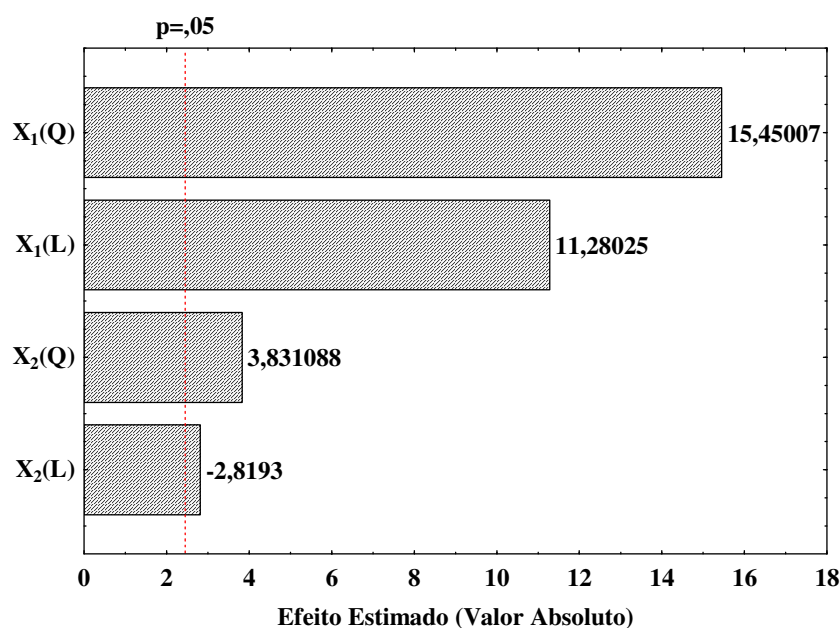


**Figura 5.4** – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta rendimento de etanol.

A Figura 5.4 mostra que todas as variáveis influenciaram no rendimento de etanol. A pressão foi a variável que mais influenciou no rendimento de etanol.

A equação do modelo empírico ajustada para o rendimento de etanol em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.1:

$$Y_{p/s} = 74,29 + 5,16 X_1 - 10,88 X_1^2 - 1,29 X_2 - 2,69 X_2^2 \quad (5.1)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,97, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 97% da variabilidade dos dados. Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 5.1, pode-se observar que a pressão absoluta de hidrólise ( $X_1$ ) contribui para o aumento da resposta rendimento de etanol.

O sinal positivo dos coeficientes  $X_1$  indica que um aumento na pressão absoluta de hidrólise proporciona um aumento no rendimento de etanol. A Tabela 5.4 confirma a

interpretação dada ao modelo. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 5.5.

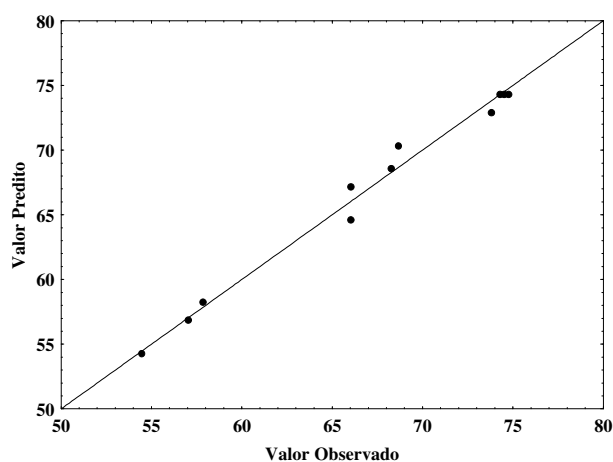


**Figura 5.5** – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.

A Figura 5.6 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta concentração de etanol.

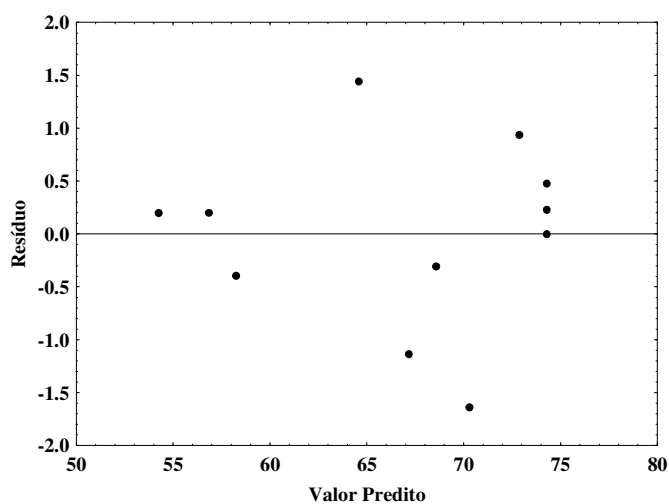


**Figura 5.6** – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 5.7 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para rendimento de etanol.

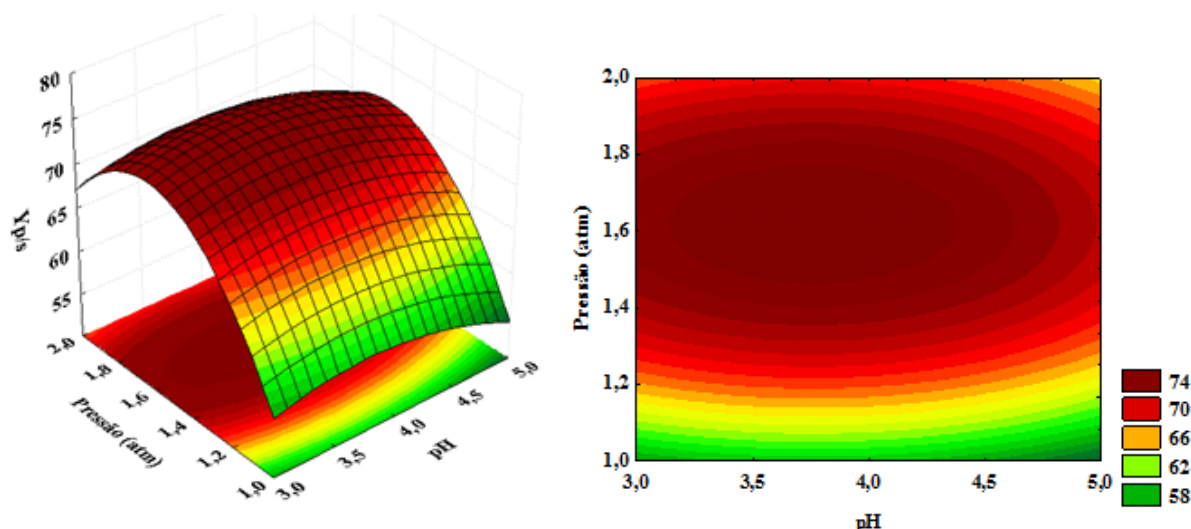


**Figura 5.7** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento de etanol em função do pH e da pressão.

Analizando a curva de contorno da Figura 5.7 definiu-se a faixa de pH de hidrólise e da pressão que maximizaram o rendimento de etanol.

A curva de contorno que representa o efeito da pressão em sinergismo com o pH de hidrólise (Figura 5.7) indica uma faixa aproximada de 1,5 a 1,7 atm para a maximização da resposta em questão. Da mesma forma que para a pressão, a partir da curva de contorno Figura 5.7, definiu-se a faixa do pH que maximiza o rendimento de etanol na região experimental trabalhada. A faixa aproximada do pH correspondente ao máximo da resposta encontra-se entre 3,3 e 4,4.

#### 5.2.1.2 Açúcar total residual

Analizando os dados apresentados na Tabela 5.4 e considerando que neste planejamento fatorial foi considerada uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta açúcar total residual, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.8).

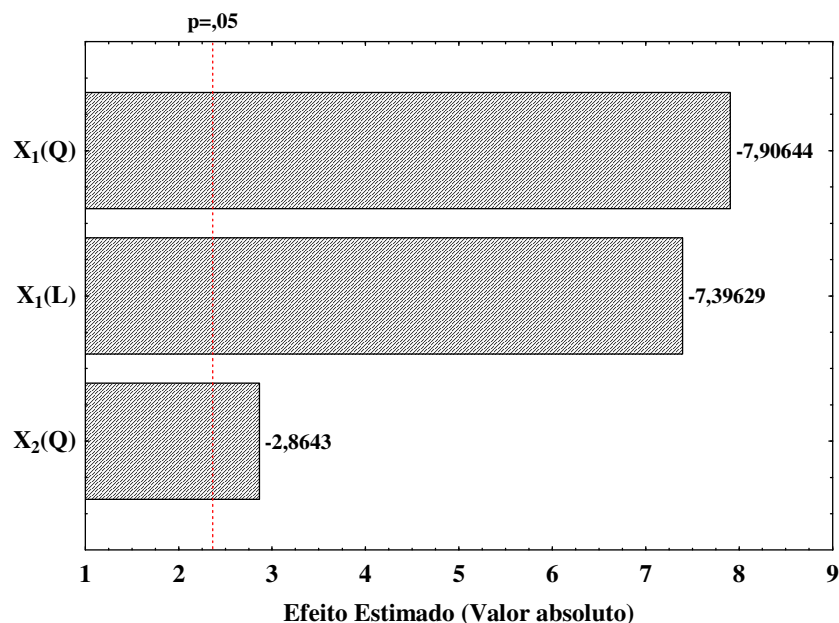


**Figura 5.8** – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta  $AT_F$ .

A Figura 5.8 mostra que nem todas as variáveis influenciaram na concentração de açúcar total residual. A pressão absoluta de hidrólise foi a variável que mais influenciou na concentração açúcar total residual.

A equação do modelo empírico ajustada para a concentração de açúcar total residual em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.2:

$$AT_F = 55,21 - 11,533 X_1 + 18,97 X_1^2 + 6,87 X_2^2 \quad (5.2)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,95, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 95% da variabilidade dos dados. Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 5.2, pode-se observar que o aumento na pressão absoluta ( $X_1$ ) contribui para redução da resposta  $AT_F$ . A Tabela 5.4 confirma a interpretação dada ao modelo. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 5.9.

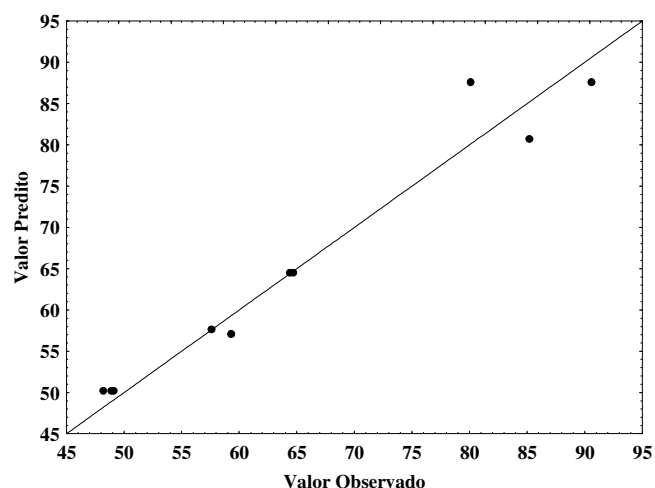


**Figura 5.9** – Valores preditos em função dos observados relativos a  $AT_F$ .

A Figura 5.10 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta  $AT_F$ .

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 5.11 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para  $AT_F$ .

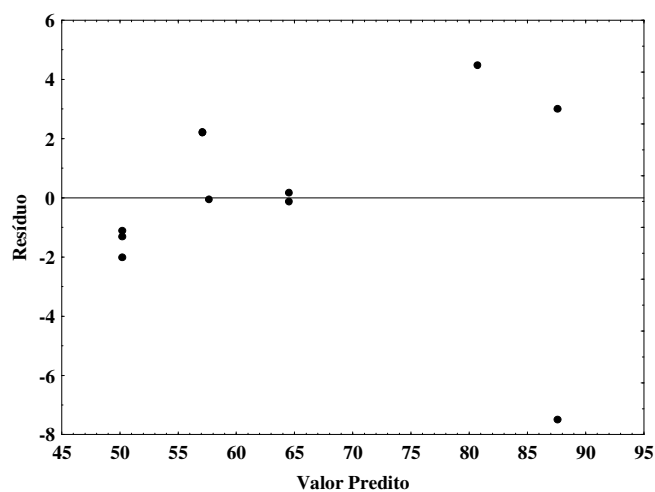


**Figura 5.10** – Distribuição dos resíduos para a resposta  $AT_F$ .

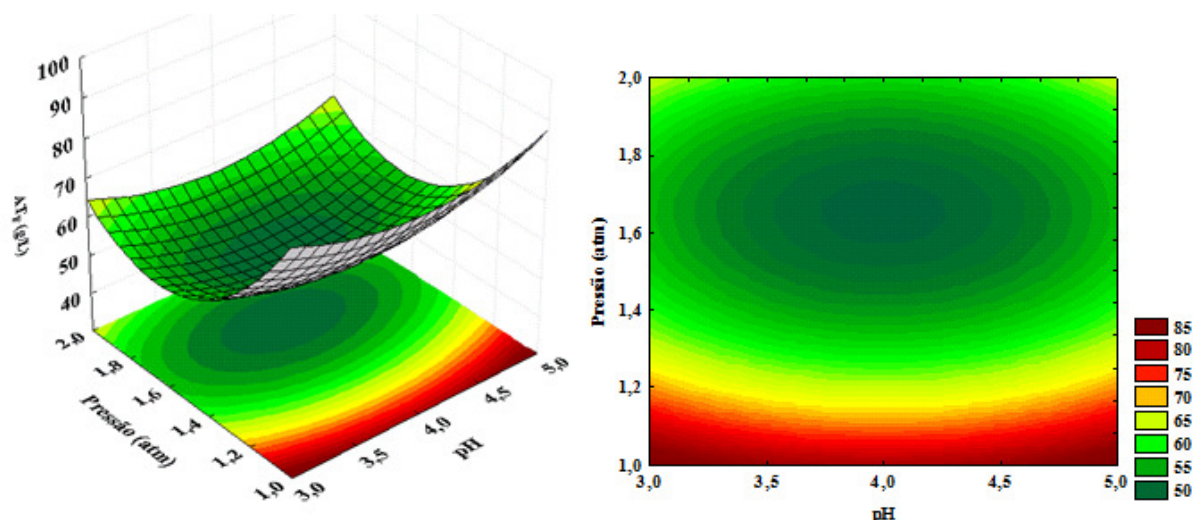


**Figura 5.11** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta  $AT_F$  em função do pH e pressão.

A curva de contorno que representa o efeito da pressão em sinergismo com o pH (Figura 5.11) indica uma faixa aproximada de 1,6 a 1,7 atm para a minimização da resposta em questão. Da mesma forma que para a pressão, a partir da curva de contorno da Figura 5.11, definiu-se que o pH em torno de 4 minimiza a concentração de açúcar total residual na região experimental trabalhada.

### 5.2.2 - Planejamento fatorial a 3 níveis para HCl

Este planejamento foi realizado com a finalidade de selecionar a melhor condição que seria comparada com os outros planejamentos usando diferentes tipos de ácidos. A Tabela 5.5 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas obtidas para a concentração de etanol (CE), açúcar total inicial ( $AT_I$ ), açúcar total residual ( $AT_F$ ), o rendimento em relação ao açúcar total inicial ( $Y'_{p/s_0}$ ) e o rendimento em relação ao açúcar total consumido ( $Y_{p/s}$ ). Como variáveis foram estudados o pH de hidrólise (pH) e pressão de hidrólise (P). Visando a comparação entre os ácidos o estudo foi feito na mesma faixa de pH e de pressão para o ácido sulfúrico e clorídrico.

Observa-se na Tabela 5.5 que a concentração de açúcar total residual variou de 50,8 g/L (experimento 5) a 90,5 g/L (experimento 7) e a concentração de etanol esteve entre 18,4 g/L (experimento 7) e 40,9 g/L (experimento 5). Verifica-se também que os pontos centrais

apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo (experimento 5, 10 e 11).

**Tabela. 5.5** – Matriz do planejamento experimental fatorial  $3^2$  para HCl valor real e codificado.

| Exp.  | X <sub>1</sub> (P)<br>(atm) | X <sub>2</sub> (pH) | AT <sub>I</sub><br>(g/L) | AT <sub>F</sub><br>(g/L) | CE<br>(g/L) | Y <sub>p/s</sub> | Y' <sub>p/s<sub>0</sub></sub> |
|-------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|------------------|-------------------------------|
| 1     | -1(1)                       | -1(3)               | 157,1                    | 86,3                     | 19,1        | 52,6             | 23,7                          |
| 2     | 0(1,5)                      | -1(3)               | 157,3                    | 59,5                     | 36,3        | 72,6             | 45,1                          |
| 3     | +1(2)                       | -1(3)               | 157,6                    | 67,5                     | 29,8        | 64,9             | 37,1                          |
| 4     | -1(1)                       | 0(4)                | 156,9                    | 87,7                     | 19,4        | 54,5             | 24,1                          |
| 5     | 0(1,5)                      | 0(4)                | 157,2                    | 50,8                     | 40,9        | 75,1             | 50,9                          |
| 6     | +1(2)                       | 0(4)                | 157,5                    | 62,9                     | 33,1        | 68,5             | 41,2                          |
| 7     | -1(1)                       | +1(5)               | 156,5                    | 90,5                     | 18,4        | 53,8             | 22,9                          |
| 8     | 0(1,5)                      | +1(5)               | 156,7                    | 57,1                     | 36,2        | 70,6             | 45,0                          |
| 9     | +1(2)                       | +1(5)               | 156,9                    | 54,2                     | 33,9        | 64,3             | 42,1                          |
| 10(C) | 0(1,5)                      | 0(4)                | 157,3                    | 51,1                     | 41,1        | 75,7             | 51,1                          |
| 11(C) | 0(1,5)                      | 0(4)                | 157,4                    | 50,4                     | 41,5        | 75,9             | 51,6                          |

CE - Concentração de Etanol ; Y<sub>p/s</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual ; AT<sub>I</sub> - Açúcar total inicial; Y'<sub>p/s<sub>0</sub></sub> - Rendimento em relação substrato inicial

### 5.2.2.1 Rendimento de etanol

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.5 e considerando que neste planejamento fatorial foi considerada uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta concentração de etanol, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.12).

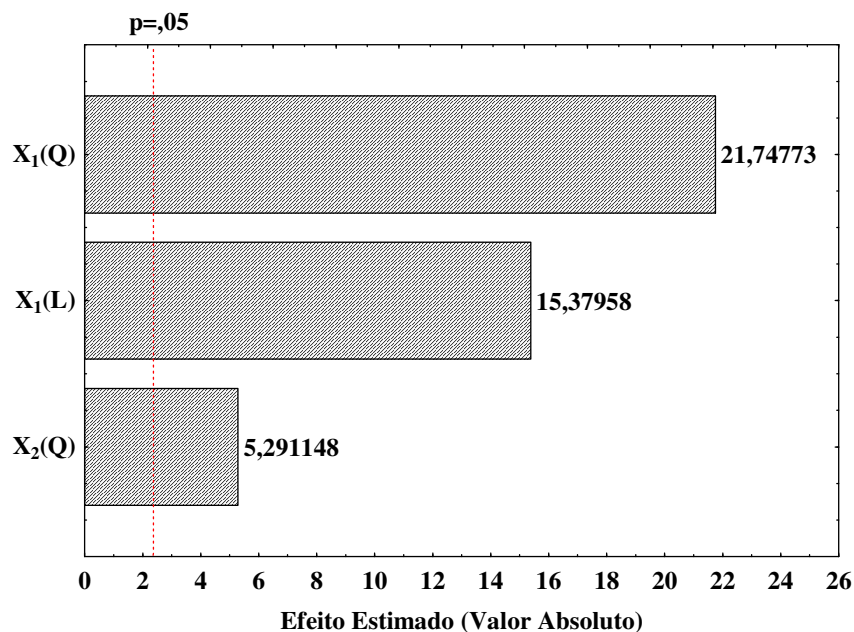


**Figura. 5.12** – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta rendimento de etanol.

A Figura 5.12 mostra que nem todas as variáveis influenciaram na concentração de etanol. A pressão de hidrólise foi a variável que mais influenciou no rendimento de etanol.

A equação do modelo empírico ajustada para rendimento de etanol em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.3:

$$Y_{p/s} = 75,27 + 6,13 X_1 - 13,34 X_1^2 - 3,24 X_2^2 \quad (5.3)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,99. O sinal positivo do coeficiente  $X_1$  indica que um aumento na pressão absoluta de hidrólise contribui para um aumento no rendimento de etanol. A Tabela 5.5 confirma a interpretação dada ao modelo comparando os experimentos 1 e 3. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 5.13.

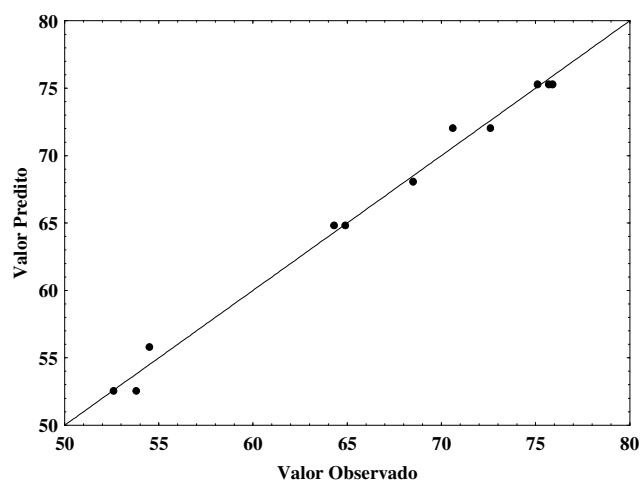


**Figura 5.13** – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.

A Figura 5.14 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta rendimento de etanol.

A Figura 5.15 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para rendimento de etanol.

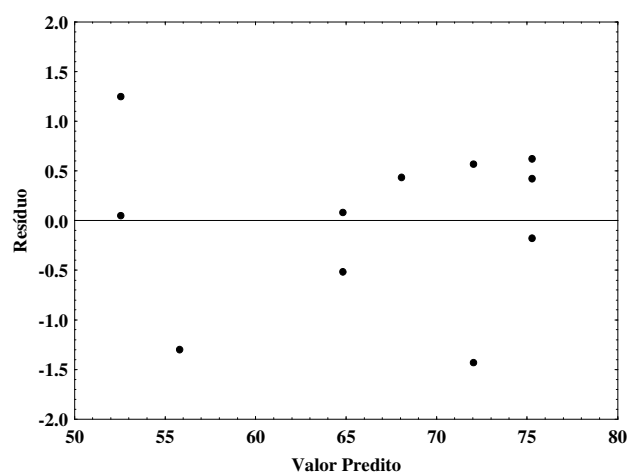


**Figura 5.14** – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.

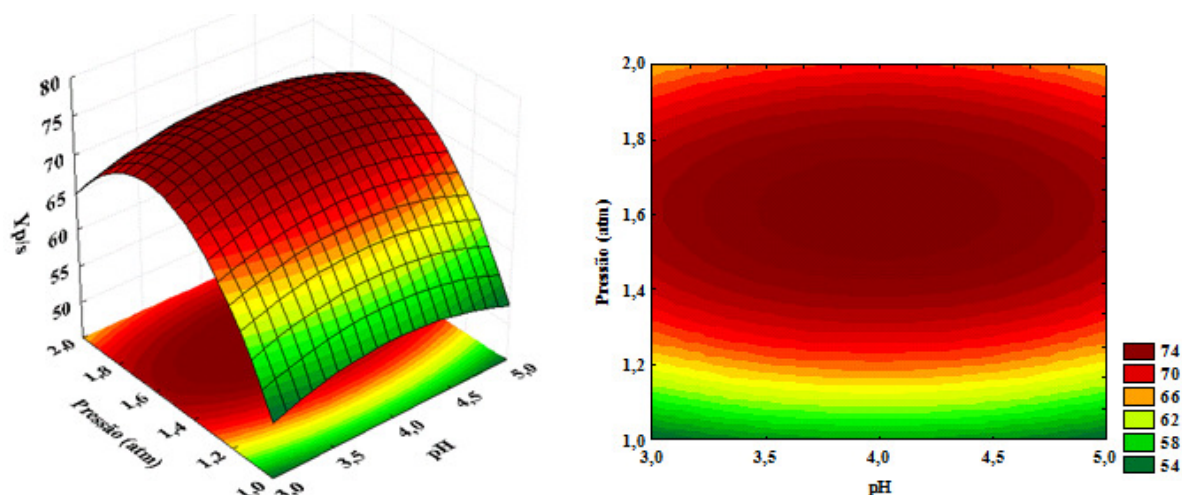


**Figura 5.15** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função do pH e pressão.

A curva de contorno que representa o efeito da pressão em sinergismo com pH de hidrólise (Figura 5.15) indica uma faixa aproximada de 1,5 a 1,7 atm para a maximização da resposta em questão. Da mesma forma que para a pressão, a partir da curva de contorno da Figura 5.15, definiu-se a faixa de pH que maximiza o rendimento de etanol na região experimental trabalhada. A faixa aproximada da concentração do ácido correspondente ao máximo da resposta está entre 3,5 a 4,5.

#### 5.2.2.2 Açúcar total residual

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.5 e considerando que neste planejamento fatorial foi adotado uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.16).

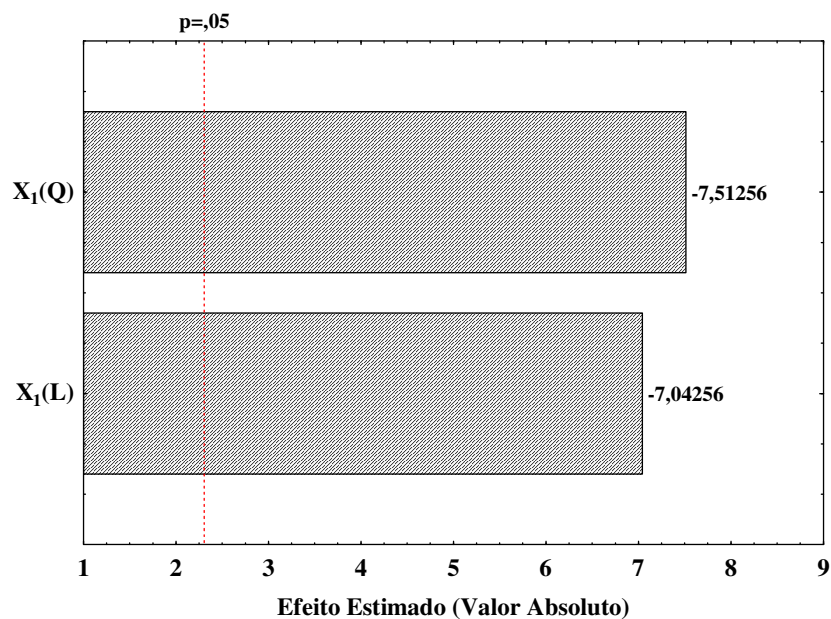


**Figura 5.16** – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta  $AT_F$ .

A Figura 5.16 mostra que somente a variável pressão de hidrólise influenciou na concentração de açúcar total residual.

A equação do modelo empírico ajustada para a concentração de açúcar total residual em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.4:

$$AT_F = 53,78 - 13,31 X_1 + 21,07 X_1^2 \quad (5.4)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,92. Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 5.4, pode-se observar que o aumento na pressão absoluta ( $X_1$ ) contribui para redução da resposta  $AT_F$ .

A Tabela 5.5 confirma a interpretação dada ao modelo. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 5.17.

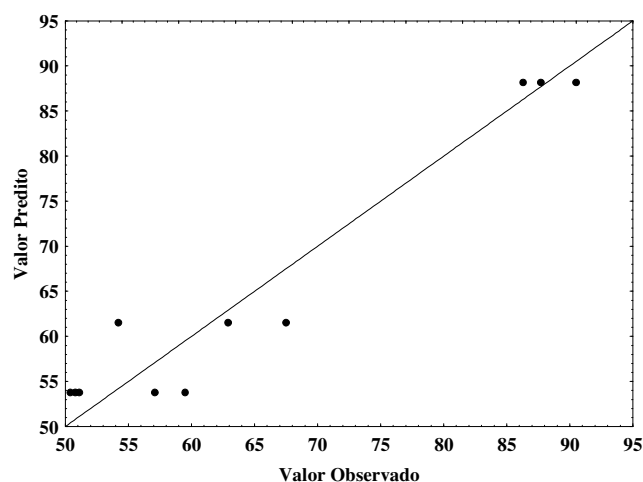


**Figura 5.17** – Valores preditos em função dos observados relativos a  $AT_F$ .

A Figura 5.18 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta  $AT_F$ .

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 5.19 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para  $AT_F$ .

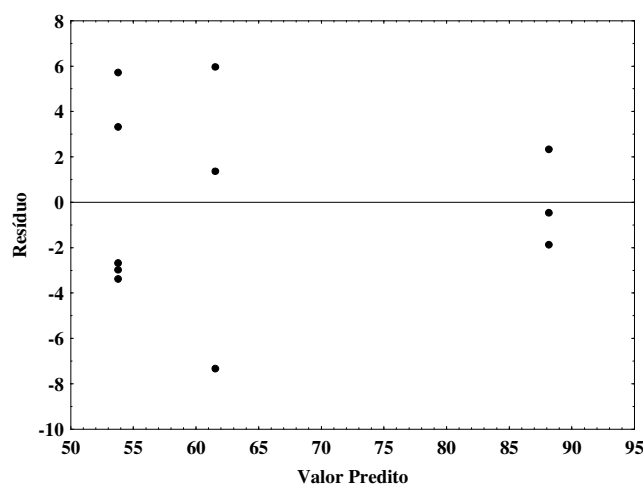


**Figura 5.18** – Distribuição dos resíduos para a resposta  $AT_F$ .

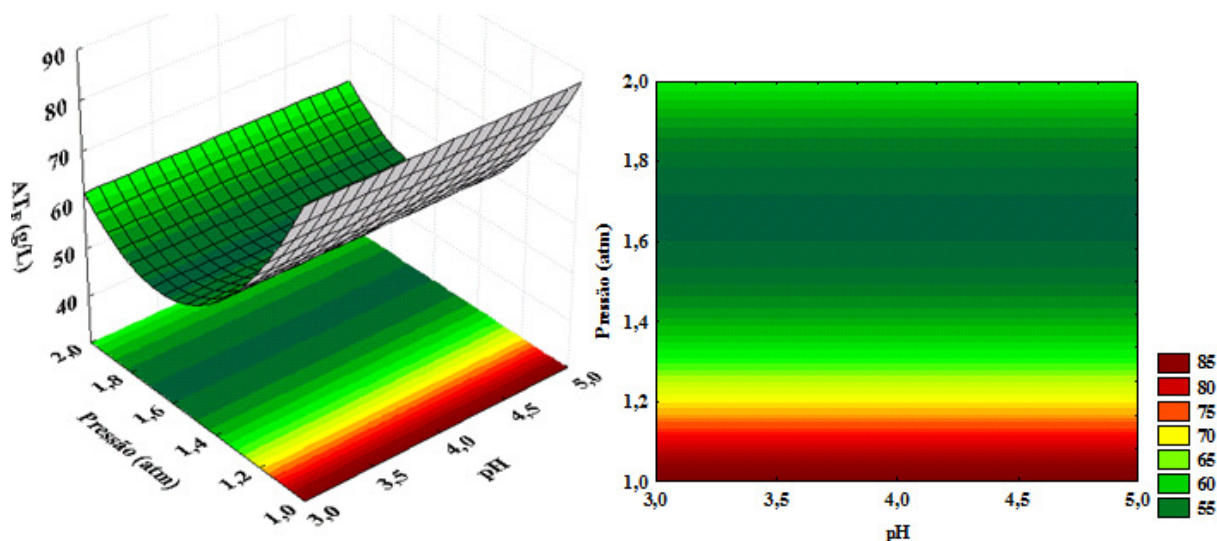


**Figura 5.19** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta  $AT_F$  em função do pH e pressão.

A curva de contorno que representa o efeito da pressão em conjunto com o pH (Figura 5.19) indica uma faixa aproximada de 1,6 a 1,7 atm para a minimização da resposta em questão. Pela Figura 5.19 nota-se que a variável pH não influencia na resposta  $AT_F$ ; pode-se trabalhar com qualquer valor de pH dentro da faixa de pressão que terá a minimização da resposta em questão.

### 5.2.3 - Planejamento fatorial a 3 níveis para $HNO_3$

Este planejamento foi realizado com a finalidade de selecionar a melhor condição que seria comparada com os outros planejamentos usando diferentes tipos de ácidos. A Tabela 5.6 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas obtidas para a concentração de etanol, açúcar total inicial, açúcar total residual, rendimento em relação ao açúcar total inicial e o rendimento em relação ao açúcar total consumido. Como variáveis foram estudados o pH de hidrólise e pressão de hidrólise.

Observa-se na Tabela 5.6 que a concentração de açúcar total residual variou de 39,6 g/L (experimento 5) a 86,2 g/L (experimento 7) e a concentração de etanol esteve entre 18,7 g/L (experimento 7) e 45,5 g/L (experimento 5). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo (experimento 5, 10 e 11).

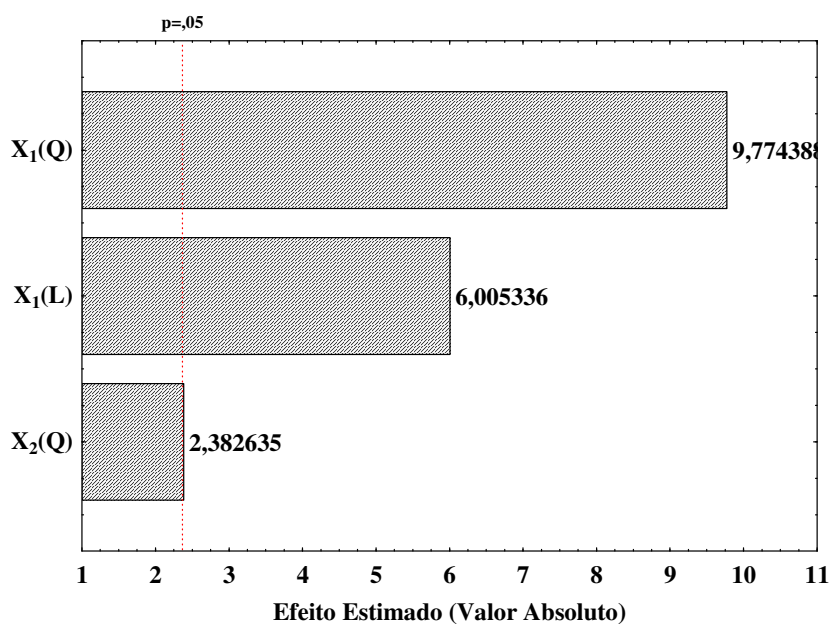
**Tabela. 5.6** – Matriz do planejamento experimental fatorial  $3^2$  para  $\text{HNO}_3$  valor real e codificado.

| Exp.  | $X_1(\text{P})$<br>(atm) | $X_2(\text{pH})$ | $AT_I$<br>(g/L) | $AT_F$<br>(g/L) | CE<br>(g/L) | $Y_{p/s}$ | $Y'_{p/s_0}$ |
|-------|--------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------|--------------|
| 1     | -1(1)                    | -1(3)            | 156,3           | 79,8            | 21,9        | 56,1      | 27,4         |
| 2     | 0(1,5)                   | -1(3)            | 156,4           | 50,8            | 40,6        | 75,4      | 50,9         |
| 3     | +1(2)                    | -1(3)            | 156,6           | 64,5            | 30,2        | 64,4      | 37,8         |
| 4     | -1(1)                    | 0(4)             | 155,9           | 82,9            | 20,7        | 55,2      | 25,9         |
| 5     | 0(1,5)                   | 0(4)             | 156,2           | 39,6            | 45,5        | 76,4      | 57,0         |
| 6     | +1(2)                    | 0(4)             | 156,4           | 47,5            | 37,8        | 68,1      | 47,3         |
| 7     | -1(1)                    | +1(5)            | 155,7           | 86,2            | 18,7        | 52,2      | 23,4         |
| 8     | 0(1,5)                   | +1(5)            | 155,8           | 49,4            | 37,5        | 68,7      | 47,0         |
| 9     | +1(2)                    | +1(5)            | 155,9           | 56,1            | 33,4        | 65,3      | 41,8         |
| 10(C) | 0(1,5)                   | 0(4)             | 156,3           | 39,7            | 45,9        | 77,1      | 57,5         |
| 11(C) | 0(1,5)                   | 0(4)             | 156,1           | 39,8            | 45,3        | 75,8      | 56,5         |

CE - Concentração de Etanol ;  $Y_{p/s}$  – Rendimento em relação ao substrato consumido;  $AT_F$  - Açúcar total residual ;  $AT_I$  - Açúcar total inicial;  $Y'_{p/s_0}$  - Rendimento em relação substrato inicial

### 5.2.3.1 Rendimento de etanol

Considerando neste planejamento fatorial uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta rendimento de etanol, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.20).

**Figura 5.20** – Diagrama de Pareto para resposta rendimento de etanol.

A equação do modelo empírico ajustada para o rendimento de etanol em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.5:

$$Y_{p/s} = 76,14 + 5,51 X_1 - 13,81 X_1^2 - 3,36 X_2^2 \quad (5.5)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,95. O sinal positivo do coeficiente  $X_1$  indica que um aumento na pressão absoluta de hidrólise contribui para um aumento no rendimento de etanol. Este fato pode ser confirmado comparando os experimentos 4 e 6. A Figura 5.21 apresenta os valores preditos em função dos observados para a produção de etanol. Nota-se nesta figura uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

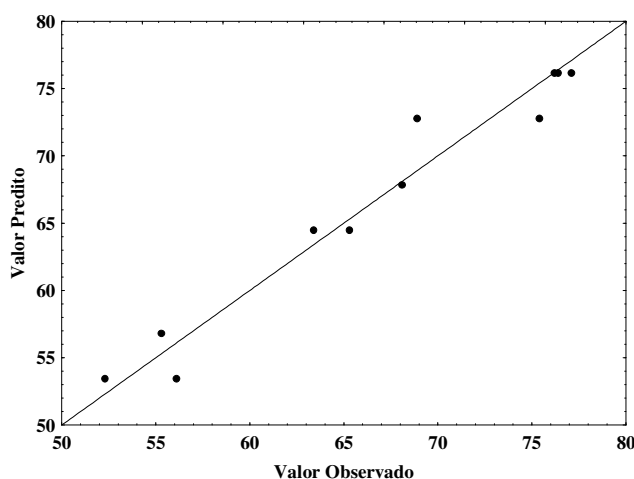


**Figura 5.21** – Valores preditos em função dos observados relativos ao rendimento de etanol.

A Figura 5.22 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta rendimento de etanol.

A Figura 5.23 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para rendimento de etanol.

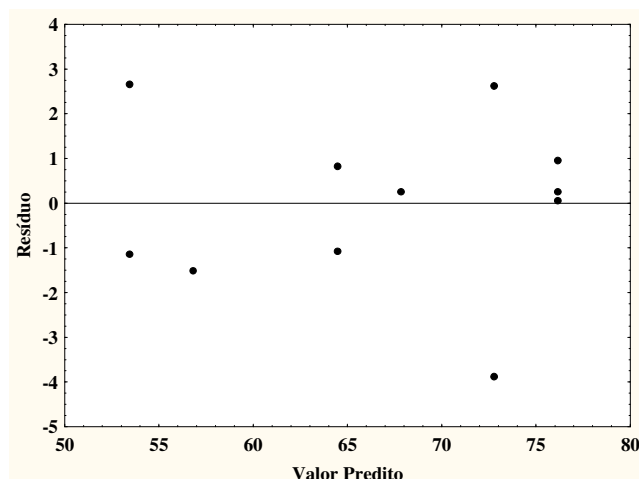


**Figura 5.22** – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento de etanol.

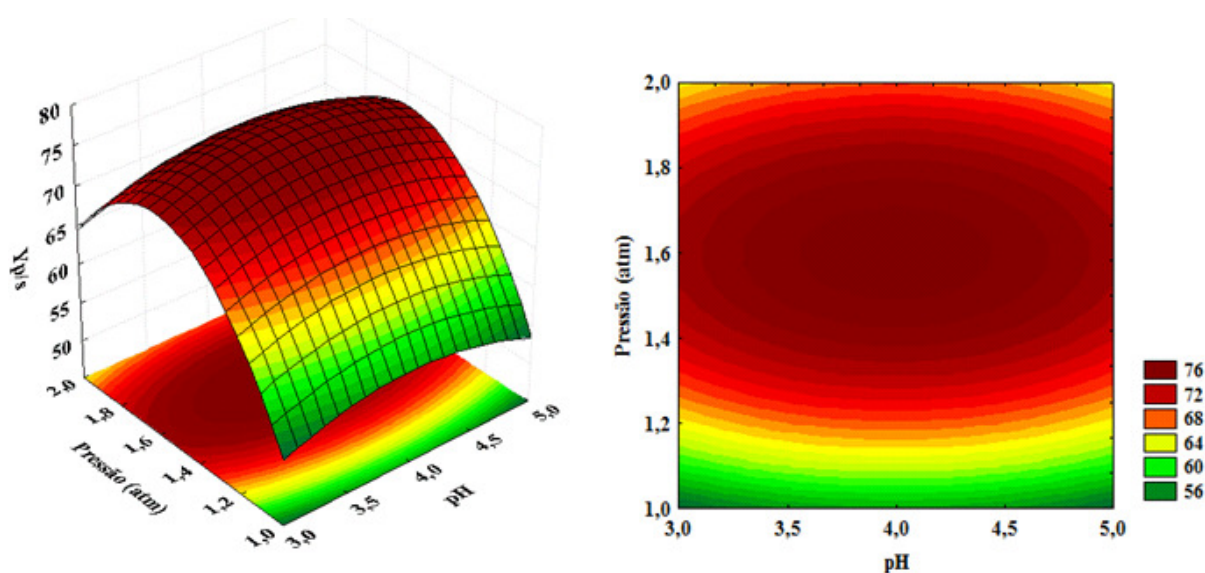


**Figura 5.23** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento de etanol em função do pH e pressão.

Analisando a curva de contorno da Figura 5.23 definiu-se que a faixa de pH e da pressão que maximiza a concentração de etanol foram de 3,5 a 4,5 e de 1,5 a 1,7, respectivamente.

### 5.2.3.2 Açúcar total residual

Através dos resultados apresentados na Tabela 5.6 e considerando um teste de hipóteses *t de Student* com uma área de rejeição de 5%, obteve-se o diagrama de Pareto representado pela Figura 5.24.

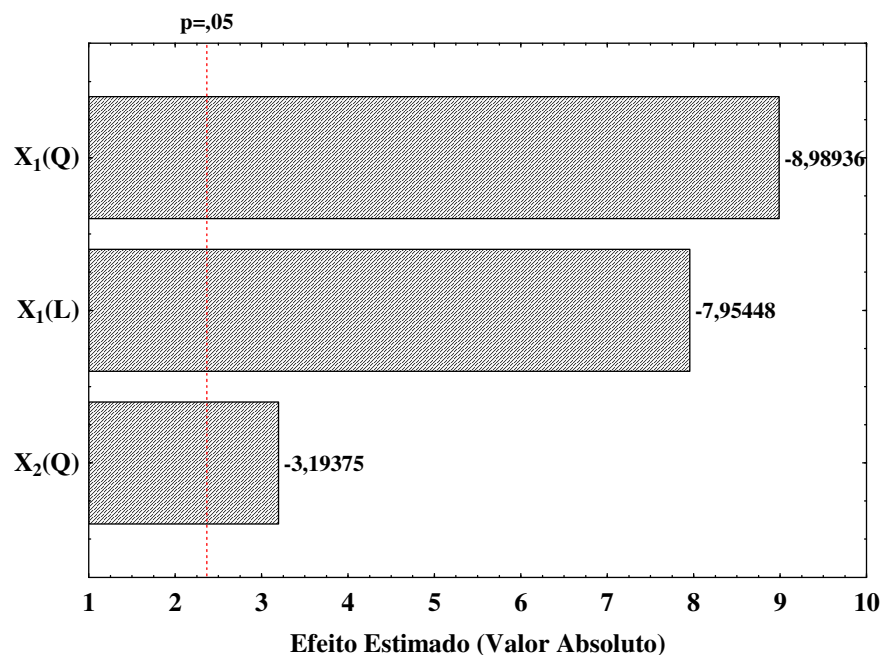


**Figura 5.24** – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta  $AT_F$ .

A Figura 5.24 mostra que a pressão absoluta de hidrólise foi a variável que mais influenciou na concentração de açúcar total residual.

A Equação 5.6 representa a equação ajustada para o modelo empírico da resposta concentração de açúcar total residual em função das variáveis significativas.

$$AT_F = 40,53 - 13,46 X_1 + 23,42 X_1^2 + 8,32 X_2^2 \quad (5.6)$$

Analisando a equação tem-se que a variável pressão é inversamente proporcional à resposta estudada isto é um aumento na pressão proporciona uma redução na concentração de açúcar total residual. A Tabela 5.6 confirma a interpretação dada ao modelo.

Após o ajuste obteve-se um  $R^2$  de 0,95, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 95% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 5.25.

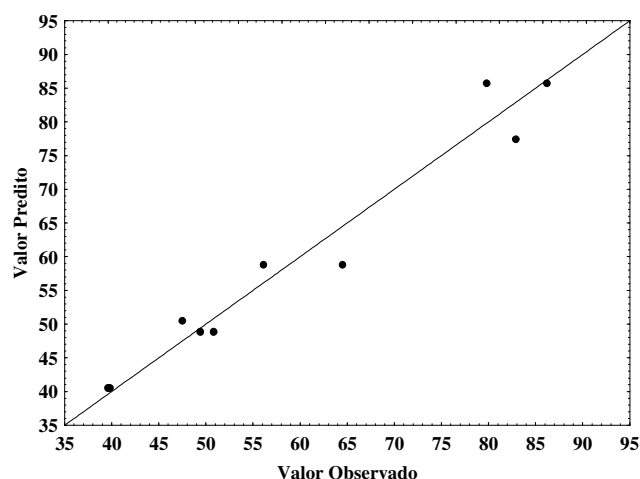


**Figura 5.25** – Valores preditos em função dos observados relativos a  $AT_F$ .

A Figura 5.26 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, o que indica normalidade para a resposta  $AT_F$ .

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 5.27 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  e  $X_2$  para  $AT_F$ .

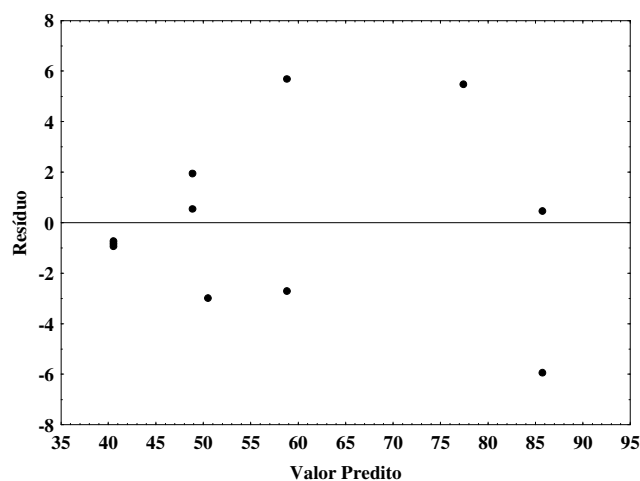


**Figura 5.26** – Distribuição dos resíduos para a resposta  $AT_F$ .

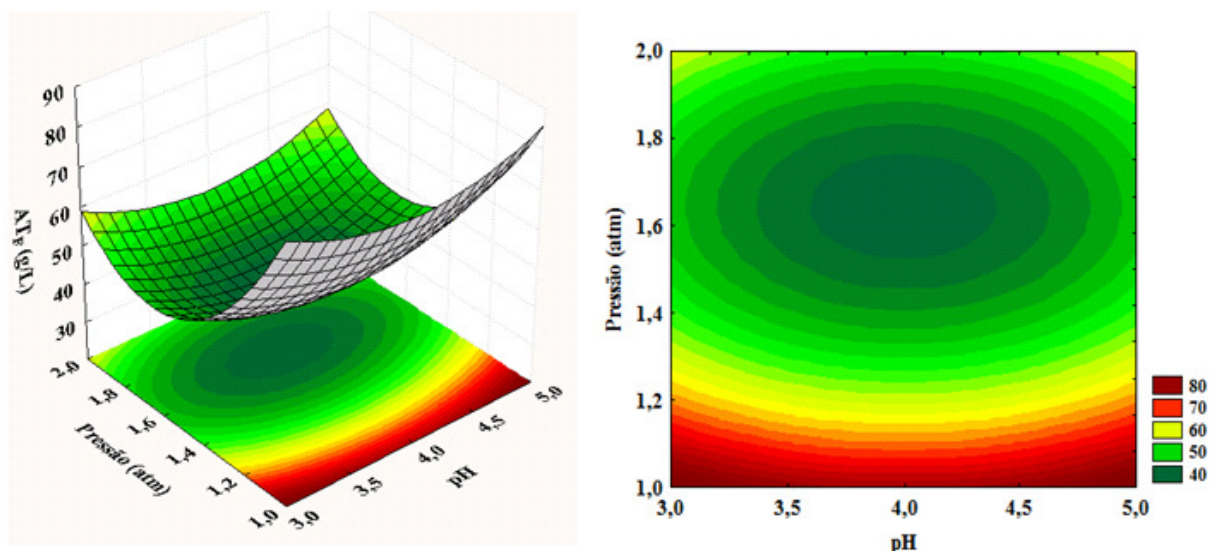


**Figura 5.27** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta  $AT_F$  em função do pH e pressão.

A superfície de resposta (Figura 5.27) mostra que existe um ponto de mínimo e esse ponto está compreendido numa faixa aproximada de 1,5 a 1,8 atm para a pressão e de 3,5 a 4,5 para o pH.

### 5.3 – Comparação entre os três ácidos testados

A Tabela 5.7 apresenta os melhores resultados obtidos nos planejamentos para cada ácido estudado. Pelas Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6 verifica-se que os pontos centrais foram os que apresentaram melhores respostas para rendimento de etanol e para concentração de açúcar total residual para os três ácidos testados. Comparando os três pontos centrais de cada ácido percebe-se que o rendimento de etanol foi maior quando usou-se o ácido nítrico na hidrólise ácida do melaço de soja, sendo assim definiu-se o ácido nítrico para continuação do trabalho.

O rendimento de etanol pode ter sido afetado na hidrólise com  $H_2SO_4$  pela formação de sulfito no meio. Segundo Amaral (2009) a concentração de sulfito interfere no rendimento de etanol. Já a hidrólise com  $HNO_3$  não afetou tanto a produção de etanol. Este fato pode estar relacionado à capacidade oxidante desse ácido que é maior comparada aos outros ácidos e provavelmente ao menor efeito inibitório do mesmo no processo fermentativo.

**Tabela 5.7** – Resultados das melhores respostas para cada ácido testado.

| Ácido                          | X <sub>1</sub> (atm) | X <sub>2</sub> | CE (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>P/S</sub> | Y' <sub>P/S0</sub> |
|--------------------------------|----------------------|----------------|----------|-----------------------|------------------|--------------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,5 (0)              | 4 (0)          | 36,9     | 49,1                  | 74,3             | 50,6               |
| HCl                            | 1,5 (0)              | 4 (0)          | 40,9     | 50,8                  | 75,1             | 50,9               |
| HNO <sub>3</sub>               | 1,5 (0)              | 4 (0)          | 45,5     | 39,6                  | 76,4             | 57,0               |

CE - Concentração de Etanol; Y<sub>P/S</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual; Y'<sub>P/S0</sub> - Rendimento em relação substrato inicial

#### 5.4 - Reprodutibilidade do processo fermentativo nas melhores condições experimentais

O ensaio do processo foi realizado, com o intuito de verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados apontados pelos modelos, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, concluiu-se que a pressão absoluta de hidrólise deve estar entre 1,5 a 1,7 atm (Figura 5.23) para a resposta rendimento de etanol e para a resposta concentração de açúcar total residual, o pH de hidrólise deve estar entre 3,5 a 4,5 para as duas respostas avaliadas

Baseando-se nas faixas de interesse para as respostas avaliadas, e considerando-se critérios técnicos e econômicos definiu-se as condições para realização dos experimentos para validação, sendo o pH escolhido de 4,5 por ser o pH da fermentação não necessitando assim de correção ao final da hidrólise e a pressão de 1,5 atm.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas pelo *Software Statistica 7.1* no item 5.2.3 definiu-se a condição ótima a ser reproduzida experimentalmente: utilizou-se pressão absoluta de hidrólise de 1,5 atm, pH de hidrólise 4,5. O teste de reprodutibilidade foi realizado com velocidade de agitação 230 rpm, concentração inicial do inóculo  $30 \pm 0,2$ g/L, pH 4,5, pressão 1,5 atm, diluição 1:4, tempo de hidrólise 20 min, tempo de fermentação 12 horas. A Tabela 5.8 apresenta a comparação dos resultados obtidos na condição selecionada com base nas superfícies de resposta usando os modelos (equações 5.5 e 5.6) encontrados para as resposta avaliada e os resultados experimentais.

**Tabela 5.8** – Resultados dos modelos e dos experimentos na condição otimizada.

|             | Y <sub>p/s</sub> | AT <sub>F</sub> (g/L) |
|-------------|------------------|-----------------------|
| Modelo      | 75,3             | 42,61                 |
| Experimento | 76,1 $\pm$ 0,2   | 41,2 $\pm$ 0,8        |

AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual; Y<sub>P/S</sub> - Rendimento em relação ao substrato consumido

Os valores obtidos pelo experimento e o modelo estão bastante próximos, o que indica que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos de rendimento de etanol quanto de concentração de açúcar total residual.

### 5.5 – Análise da influência da concentração de inóculo no rendimento de etanol

A Tabela 5.9 mostra os resultados obtidos para concentração de etanol em relação à variação da concentração de levedura no meio fermentativo. A Tabela 5.9 mostra os resultados para a pressão absoluta de 1,5 atm.

**Tabela 5.9** – Resultados dos experimentos variando a concentração de inóculo para pressão de 1,5 atm.

| Concentração de inóculo<br>(g/L) | AT <sub>I</sub> (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | CE <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>p/s</sub> | Y' <sub>p/s<sub>0</sub></sub> |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-------------------------------|
| 25                               | 156,7                 | 47,5                  | 38,9                  | 69,7             | 48,6                          |
| 30                               | 156,7                 | 37,1                  | 43,7                  | 71,5             | 54,6                          |
| 35                               | 156,7                 | 42,9                  | 47,3                  | 81,3             | 59,1                          |
| 40                               | 156,7                 | 42,2                  | 47                    | 80,3             | 58,7                          |
| 45                               | 156,7                 | 43,4                  | 46,2                  | 79,8             | 57,7                          |

Analisando os valores apresentados nas Tabelas 5.9 nota-se que não houve aumento significativo no rendimento para um concentração acima de 35 g/L de inóculo, sendo assim definiu-se a concentração de 35 g/L como a condição ótima.

### 5.6 - Cinética para avaliar o melhor tempo de fermentação no reator, empregando condições otimizadas para o ácido nítrico

O ensaio realizado no reator teve o intuito de verificar qual o melhor tempo de fermentação no reator, após otimização do processo em relação as variáveis pressão de hidrólise, pH de hidrólise e concentração de inóculo, para as respostas concentração de açúcar total residual (AT<sub>F</sub>) e rendimento de etanol (Y<sub>p/s</sub>). A cinética foi realizada nas condições otimizadas anteriormente com a concentração inicial de micro-organismo  $35 \pm 0,2$  g/L, pH 4,5, temperatura de  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 230 rpm e um volume de inóculo de 30% do volume total do meio. Alíquotas de 30 mL foram retiradas para análises das respostas de duas em duas horas.

A Figura 5.28, obtida no *Origin Graph 8.0* mostra a cinética de fermentação em relação ao consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular.

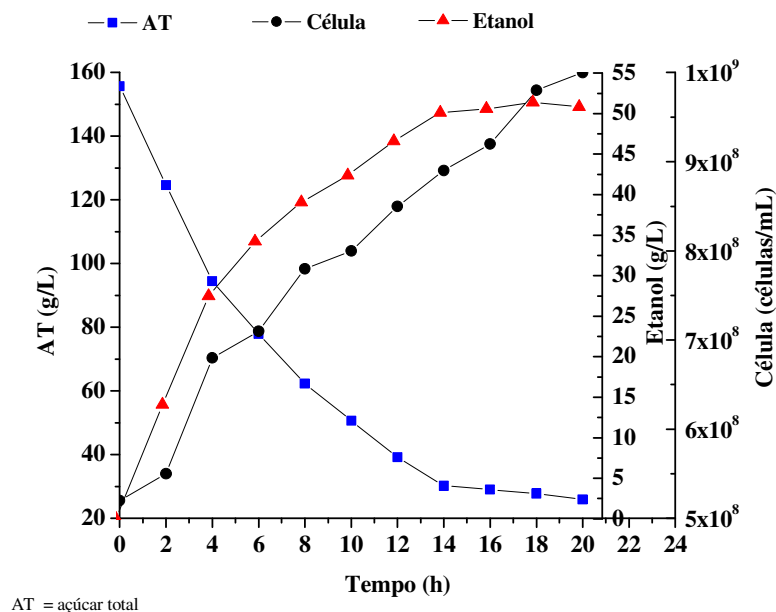


**Figura. 5.28** – Evolução ao longo do tempo das concentrações de etanol (▲), açúcar total (■), celular (●) em relação ao tempo de fermentação para o ácido nítrico nas condições otimizadas.

Nota-se na Figura 5.28 que a concentração de etanol aumenta de forma significativa nas primeiras horas de fermentação, sendo que após 14 horas de fermentação a produção de etanol permaneceu constante e o consumo de açúcar total sofreu uma pequena redução. O rendimento em relação a concentração de açúcar total consumido (Equação 4.7) foi de 78 % e a produtividade 3,57 g/ L.h. O crescimento celular foi muito pequeno (variando de  $5,2 \cdot 10^8$  célula/mL até  $1,2 \cdot 10^9$  célula/mL) o que já era esperado pois a fermentação foi iniciada com uma alta concentração celular.

Assim adotou-se o tempo de 14 horas para a fermentação alcoólica do melaço de soja hidrolisado com ácido nítrico.

Machado (1999) obteve uma concentração de etanol do hidrolisado ácido do melaço empregando ácido sulfúrico de 33,9 g/L partindo de uma concentração de açúcar total de 114,6 g/L, com um tempo de fermentação de 34 horas. Segundo Machado (1999), o processo de hidrólise ácida do melaço disponibiliza uma grande quantidade de açúcar redutor, mas o substrato não apresenta conversão maior que a do melaço de soja aditivado com  $\text{MgSO}_4$ .

Letti (2007) realizou uma hidrólise ácida do melaço de soja empregando os ácidos sulfúrico, clorídrico e fosfórico seguida de uma fermentação empregando *Zymomonas mobilis*. A concentração de etanol foi de aproximadamente 28 g/L, não apresentando diferença significativa entre os ácidos testados com uma concentração média de açúcar total de 90 g/L.

Siqueira (2007) relatou que o uso da hidrólise ácida no melaço de soja proporciona um aumento de 17% na produção de etanol referente ao açúcar total e que o uso da hidrólise enzimática proporciona um aumento de 20%.

Pavlak et al. (2011) avaliou a produção de etanol através do hidrolisado enzimático do mosto de batata-doce obtendo para uma concentração de 12 °Brix um rendimento em relação ao teórico 0,511 de 97,5 % durante 36 horas de fermentação utilizando a linhagem PE-2 em um processo batelada.

Arasaratnam et al. (1993) verificou que o rendimento de etanol diminuía com o aumento da concentração do substrato, sendo o rendimento encontrado de 76% para uma concentração inicial de 16 % de hidrolisado de amido de milho, e de 50,2 % para uma concentração de 40%.

Entretanto, do ponto de vista econômico o ideal é obter altas concentrações de etanol com baixos custos do processo de destilação e com o uso de concentrações iniciais de substrato mais altas, possibilitando que o volume de reator necessário seja menor (BARAS, 2002).

Mojovic' et al. (2006), estudou as condições de hidrólise do amido de milho avaliando dois tipos de enzima realizando após a hidrólise uma fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento obtido após 32 horas de fermentação foi de 81,6 % com uma concentração inicial de amido de milho antes da hidrólise de 17,5 % (w/w).

Na fermentação utilizando como substrato o melaço de beterraba Razmovski et al. (2011) obteve um rendimento de 96% em cima do teórico com 24 horas de fermentação para uma concentração inicial de 130 g/L de açúcar redutor utilizando a técnica de imobilização de levedura.

Quando se considera o substrato formado de sacarose, juntamente com pequenas porcentagens de glicose e frutose, como na indústria brasileira de etanol, o açúcar é definido como açúcar redutor total (ART) e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de ART. Quando o rendimento estequiométrico é calculado com base na sacarose o valor do mesmo é 0,538 g de etanol por grama de sacarose. Na prática industrial o rendimento da fermentação alcoólica bem conduzida atinge de 90 a 92% do rendimento

estequiométrico, havendo um consumo de açúcar para formação de biomassa celular e subprodutos. Se ocorrer contaminação acentuada do meio, este rendimento é ainda menor (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações de até 12 a 14% v/v em fermentação normal. O gás carbônico, segundo produto da fermentação alcoólica, tem um rendimento de 0,4 a 0,5 gramas de CO<sub>2</sub> por grama de açúcar degradado consumido (BARRE et al., 2004).

Segundo Viegas (2003), uma unidade de fermentação contínua convencional, ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes, geralmente opera com rendimento de 87% e produtividade de 7,9 g<sub>etanol</sub>/L.h quando melaço é utilizado como matéria-prima. Os resultados obtidos nesse trabalho para a produção de etanol, quando comparado com os obtidos com melaço de cana, apresentaram valores inferiores. Mas não apresentou resultados inferiores quando comparados com substratos diferente do caldo de cana. Sendo assim este substrato merece estudos mais aprofundados, pois a tecnologia da fermentação alcoólica utilizando cana já é bem madura, e com aplicação industrial a mais de 30 anos. Vale ressaltar, que a levedura utilizada foi desenvolvida para a produção de etanol empregando como matéria prima caldo de cana de açúcar. Além disso, o hidrolisado obtido é constituído de um conjunto de açúcares e outros compostos que provavelmente interferiram no processo metabólico da levedura.

### **5.7 – Retirada de etanol utilizando Evaporador Rotativo**

A finalidade dos experimentos realizados usando o evaporador rotativo era de realizar a fermentação com uma menor diluição do substrato obtendo um maior rendimento de etanol. Realizou-se três fermentações consecutivas sendo que após a primeira fermentação parte do etanol produzido foi retirado através do evaporador rotativo e colocou-se o caldo resultante para fermentar novamente. A Tabela 5.10 mostra os resultados obtidos em cada fermentação e evaporação.

**Tabela. 5.10** – Resultados dos experimentos usando evaporador rotativo.

| Exp.               | AT <sub>I</sub> (g/L) | AT <sub>F</sub> (g/L) | CE <sub>I</sub> (g/L) | CE <sub>F</sub> (g/L) | Y <sub>p/s</sub> | Y' <sub>p/s0</sub> |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 1º fermentação     | 312,8                 | 150,9                 | 0                     | 61,8                  | 74,8             | 38,7               |
| Após 1º evaporação | 150,9                 | 238,4                 | 61,8                  | 22,7                  | -                | -                  |
| 2º fermentação     | 166,9                 | 70,2                  | 15,8                  | 53,3                  | 75,9             | 44,0               |
| Após 2º evaporação | 70,2                  | 87,7                  | 53,3                  | 23,6                  | -                | -                  |
| 3º fermentação     | 60,5                  | 24,2                  | 16,3                  | 25,8                  | 51,2             | 30,7               |

CE<sub>I</sub> - Concentração de Etanol inicial ; CE<sub>F</sub> - Concentração de Etanol final; Y<sub>p/s</sub> – Rendimento em relação ao substrato consumido; AT<sub>F</sub> - Açúcar total residual; AT<sub>I</sub> - Açúcar total inicial; Y'<sub>p/s0</sub> - Rendimento em relação substrato inicial

Analisando os resultados mostrados na Tabela 5.10 percebe-se que após a retirada do etanol o caldo volta a ser fermentado novamente pelas leveduras, viabilizando o consumo do açúcar residual em fermentações consecutivas. Observa-se que os rendimentos obtidos na segunda fermentação foram superiores aos da primeira fermentação. Este fato pode indicar uma pequena inibição devido à alta concentração de açúcar na primeira fermentação. Nota-se também que na terceira fermentação o rendimento diminui sensivelmente. Este comportamento pode estar relacionado às inibições devido aos subprodutos produzidos nos processos fermentativos anteriores. Segundo BOBBIO et al. (2001) em temperaturas elevadas ocorrem duas transformações químicas envolvendo os carboidratos, sendo elas a reação de Maillard com degradação de Strecker e a caramelização, ocorrendo a degradação do carboidrato e formando compostos voláteis. As reações de Maillard podem produzir compostos como o acetaldeído, o benzaldeído, o formol e o aldeído láctico. A caramelização pode produzir ácido fórmico, acético, hidroximetilfurfural que inibe o processo fermentativo.

Estes resultados indicam que o uso de uma diluição menor (1:2) do hidrolisado ácido do melaço de soja torna-se viável diminuindo assim o volume de água na diluição consequentemente uma redução na energia na parte de destilação e de resíduo gerado ao final da fermentação.

Navarro et al. (2000) estudou o reciclo da vinhaça no processo fermentativo com o intuito de diminuir a quantidade de água utilizada na diluição do caldo de cana, considerando que a quantidade de água necessária para a preparação do meio de fermentação em indústria de produção de etanol é cerca de 77% do total utilizado na indústria. A reutilização da vinhaça reduz-se 60% a 46,2% a quantidade de água necessária sendo a proporção de 60 % da

vinhaça o ideal, mantendo a concentração de compostos indesejáveis abaixo do nível de toxicidade e viabilizando a produção de etanol sem inibição.

A concentração total de etanol obtida nas três fermentações foi de 108,8 g/L apresentando um rendimento total em relação ao substrato consumido de 73,8%. Percebe-se que não houve remoção de todo o etanol do fermentado iniciando a segunda fermentação e a terceira com uma quantidade de etanol no meio. O ideal, para aumentar a produtividade, seria retirar todo o etanol na primeira evaporação para necessitar somente de duas fermentações. O rendimento de etanol pode ser aumentado com a utilização de processos que promovam a maior retirada de etanol como o uso de um sistema *flash*, com a reutilização da levedura e com a otimização das condições para essas fermentações consecutivas a partir de melaço de soja com concentrações iniciais do substrato mais elevadas.

---

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

---

#### 6.1 - Conclusões

A partir dos resultados foi possível observar que o melaço de soja apresenta um potencial para a produção de etanol sendo que:

- A diluição 1:4 do melaço de soja com um tempo de hidrólise de 20 min apresentou melhor rendimento para todos os ácidos estudados;
- Os pontos centrais pH (4) e pressão absoluta de hidrólise (1,5 atm) foram os que apresentaram maior rendimento de etanol e menor concentração de açúcar total residual para todos os ácidos;
- O ácido que obteve uma produção maior de etanol foi o ácido nítrico;
- Nas melhores condições selecionadas pela técnica de superfície de respostas para as variáveis pH (4,5) e pressão absoluta de hidrólise (1,5 atm), com ácido nítrico produziu-se 50,1 g/L de etanol, com um rendimento de etanol em relação ao açúcar total inicial de 60% e um rendimento de etanol em relação ao açúcar total consumido de 78% , com uma produtividade de 3,57 g/ L.h;
- O tempo de fermentação na condição ótima foi de 14 horas;
- O uso do evaporador rotativo mostrou-se eficiente para o uso do melaço em uma menor diluição.

#### 6.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Testar a viabilidade de utilizar reciclo de levedura;
- Montar um sistema com separação Flash e/ou de destilação extrativa para a retirada de etanol do meio fermentativo e, assim, possibilitar a utilização de melaços mais concentrados. Avaliar o uso do melaço de soja em processos fermentativos com caldo de cana;
- Avaliar a fermentação do melaço de soja com outras variedades de cepas;
- Realizar experimentos avaliando mais pontos de pressão e pH;
- Comparar a hidrólise ácida com a hidrólise enzimática;
- Avaliar por meio de modelagem a obtenção de parâmetros para os estudos cinéticos realizados.

---

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABIOVE, Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em <[http://www.abiove.com.br/exporta\\_br.html](http://www.abiove.com.br/exporta_br.html)>. Acesso em: 28 de abril de 2011.

AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. One-stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters. *Jornal of food science*, Chicago, v.52, n.6, p.1570-1576, 1987.

ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinot. Semana da Fermentação Alcoólica. *Anais*, Piracicaba, p. 254-262, 1960.

ALTINTAS, M. M.; ÜLGEN, K. Ö; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; OLIVER, S. G. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 640 - 647, 2002.

ALVES, D. M. G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. Tese (Doutorado) - Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 64 p., 1994.

AMARAL, F. S. *Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, 107 p., 2009.

AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba. São Paulo, Fermentec, 448p., 2005.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D. M.G. *Processo de Produção de Álcool Controle e Monitoramento*. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.

ANACLETO, J.; VAN UNDEN, N. Kinetics and activation energetic of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphur dioxide. *Biotech. Bioeng.*, v.34, p. 24477-2486, 1982.

ANDERSON, J.J.B.; ANTHONY, M.; MESSINA, M.; GARNER, S.C. Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition Reviews*, v.12, p75-116, 1999.

ANDRIETTA, S.R. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial*. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de 79 Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 178 p., 1994.

ANDRIETTA, S.R. Seleção de leveduras flocculantes para uso em reatores (tipo torre) fluidizados na produção de etanol. Campinas. Projeto Científico. Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA, Divisão de Biotecnologia e Processos, p. 2-15, 2004.

ARASARATNAM, V.; BALASUBRAMANIAM, K. Synergistic action of alpha-amylase and glucoamylase on raw corn. *Starch/Starke*, n. 45 p. 231–3, 1993.

ARAUJO, M.F.; GOMES, J.C.; SANT'ANNA, R.; SILVA, D.J. "Caracterização Química de um Isolado Protéico de Soja Produzido no Brasil", *Rev. Ceres*, v 33, n. 188, pp. 320-329, 1986,

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, p. 89-105, 2008.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial application of sugarcane bagasse: A technological perspective. *International Sugar Journal*, 104: (1238), p. 64-70, 2002.

BARAS, J.; GACESA, S.; PEJIN, D. Ethanol is a strategic raw material. *Chem Ind.*; n. 56 p. 89–105, 2002.

BARGA, M. C., *Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido*. Dissertação-Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; ASSO, L. C., *Fisiologia e ecologia microbiana*, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BARTHOLOMAI, A. *Fábricas de alimentos: processos, equipamentos, custos*. Zafagoza: Ed. Acriba S.A., 293p., 1987.

BASSO, L.C. In: ALVES, D.M.G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. (Tese Doutorado) - ESALQ. Piracicaba, 199 p., 1991.

BASTOS, V. D. *Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias*. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BAZINET, L. *et al.* Eletoacidification of soybean proteins for production of isolate. *Food Technology*, Chicago, v.51, n.9, p.52-58, 1997.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. *Química do processamento de alimentos*. Cap 4, p.47-78, 3 ° ed. Livraria Varela, 2001.

CAMPOS, S. A Qualidade da Soja Processada e a Importância de Eliminar os Fatores Anti-Nutricionais. *Medicina Avançada*. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/>> 2006.

CARTWRIGHT, C. P.; ROSE, A. H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M. H. J. *Solute Transport*. In: *The Yeasts*, Ed. ROSE, A. H., Academic Press, London, v.3, p. 5-56, 1989.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. *Fermentação Descontínua Alimentada*. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

CHEPPACH, W.; LUETHERS, H.; MELCHER, R.; GOSTNER, A.; SCHAUBER, J.; KUDLICH, T. antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clinical Nutrition Supplements*, v.1, p.51-58, 2004.

CYSEWSKY, G. R.; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. *Biotech. Bioeng.* v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.

DE BRUIJN, J. M.; KIEBOOM, A. P. G. and VAN BE KKUM, H. Reaction of monossaccharides in aqueous alkaline solutions. *Sugar Technology Reviews*, 13 p. 21-52, 1986.

DE LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legume. *Food Structure*, v.11, p.33-46, 1992.

DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.299-307, 1990.

DORTA, C. *Synergism among lactic, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). Tese (Doutorado) - Rio Claro - SP, Universidade Estadual Paulista, 144 p, 2006.

FERNANDES JÚNIOR, C. C. *Integração Energética da Etapa de Extração de Óleo de Soja, Utilizando a Análise Pinch*. (Dissertação Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 80 p. 2009.

FERREIRA, O. C. Avaliação preliminar do potencial de produção de etanol da cana de açúcar. n. 34, 2002. Disponível em [http://ecen.com/eee34/limites\\_alcool.htm](http://ecen.com/eee34/limites_alcool.htm) acesso em 17 fev. de 2011.

FISATOM- Equipamentos Científicos Ltda. Disponível em <http://www.fisatom.com.br/> Acesso em: 20 de junho de 2011.

GALASSI, G. R. *Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre*. Dissertação - (Mestrado) em Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, 90 p., 2007.

GUANDALINI, G. & SILVA, C. A dupla conquista. *Revista Veja*. p.90-94, ed. 1941 de 1º de fevereiro de 2006.

GOMES, E. *Efeito do tratamento ácido da levedura Saccharomyces cerevisiae na fermentação alcoólica*. (Dissertação Mestrado) Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 206, 1988.

HETTIARACCHY, N.S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, Chicago, v.62, n.6, p.1110-1115, 1997.

HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1020 p., 1991.

IRISH, G.G. et al. Renoval of the alpha-galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performace. *Poultry Science*, Saskatoon, v.74, n.9, p.1484-1494, 1998.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemist.*, v.16, p. 42-49, 1981.

KARR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass & Bioenergy*, 14: (3), p. 277-287, 1998.

KHARE, S.K.; KRISHNA, J. Entrapment of wheat phytate in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis. *Biotechnology applied biochemistry*, v. 19, p. 193-198, 1994.

LETTI, L. A. J. *Production of Bioethanol by Soybean Molasses Fermentation by Zymomonas Mobilis*. (Dissertação Mestrado) Curitiba, Universidade Federal do Paraná, p. 50, 2007.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios-aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas. *Química Nova*, v.22, p.229-243, 1999.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. *Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira*. Curitiba: Editora UFPR, 248p., 2002.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, v.3. p.1-43, 2001.

MACEDO, I. C., NOGUEIRA, L. A. H. *Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos*. Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil, p.141, 2005.

MACHADO, R. P., *Produção de etanol a partir de melão de soja*. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRS. Porto Alegre, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brook*, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.

MAFRA, P. H. *Sulfitação do caldo de cana-de-açúcar e aspectos ambientais decorrentes*. (Dissertação Mestrado). Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 159 p., 2004.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Alcohol production and recovery. *Advantages in biochemical engineering*, v.20, p. 41-73, 1981.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 9, p 426 – 428, 1959.

- MONACO, M. A. S. L. *Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae**. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 64, 2007.
- MONTEIRO, A. R. G., *Introdução à Análise Sensorial de Alimentos*. Maringá, EDUEM, Editora da Universidade Estadual de Maringá, 47 p., 2000.
- MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. *Soja: Suas Aplicações*. Rio de Janeiro, MEDSI, Editora Médica e Científica, 259 p., 1996.
- MOREIRA, A. M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, *Anais*, p.99-104, 1999.
- MOJOVIC', L. et al. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*, n. 85 p. 1750–1755, 2006.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C. & INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J.of Ind. Microb. And Biotech.*, v.26, p. 171-177, 2001.
- NAVARRO, A. R. et al. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management* v. 20, p. 581-585, 2000.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98, p. 49-58, 2002.
- O'CONNOR, D. O.; RUBINO, J. R. *Phenolic Compounds. IN: Seymour S. Block, Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Cap.12, p.204-224, 4º ed. Lea & Febiger Philadelphia/London 1991.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p. 10-14, 2001.
- OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, n.6, p.1197-1212, 1974.
- PAIVA, T. C. B.; SATO, S.; VISCONTI A. E. S.; CASTRO, L.A.B.; Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57, n.58, p.535-541, 1996.
- PARAÍSO, Paulo R. *Modelagem e Análise do Processo de Obtenção de Óleo de Soja*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 220p., 2001.
- PAVLAK, M. C. M. et al. Estudo da Fermentação do hidrolisado de batata-doce Utilizando Diferentes Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. *Quim. Nova*, v. 34, n. 1, 82-86, 2011.

PORTO, A.; OLIVEIRA, L. *Tabela da Composição de Alimentos*, Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, p. 72, 2006.

POTTER, N. N.; HOTCKISS, J. H. *Food Science*. Ed 5. New York: Ed. Chapman & Hall, 608p., 1997.

RAZMOVSKI, R. et al. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, p. 378–385, 2011.

RECH, R. et al. *Curso de processamento de soja*. UFRGS, Porto Alegre, 1998.

REZENDE, S. T., FELIX, C. R. Rafinose-hydrolyzing activity of *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology letters*, Kew, v.19, n.3, p.217-220, 1997.

RODRIGUES, F. A. *Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana*. (Dissertação Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Campinas, 2007.

RODRIGUES, M. I.; ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI FILHO, F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. *Stab. Açúcar, Álcool e Sub-produtos*, v.10, n.5, p.35-47, 1992.

SANTIAGO, P. A. *Contribuição o estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluveromyces marxianus**. (Dissertação Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia, 2002.

SCHEPPACH, W.; LUETHRS, H.; MELCHER, R.; GOSTNER, A.; SCHAUBER, J.; KUDLICH, T. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clinical Nutrition Supplements*, v.1, p. 51-58, 2004.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. *Biorreatores e Processos Fermentativos*. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, p. 179-192. (Biotechnologia Industrial; v.2), 2001.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M.G; SEDIYAMA, C.S.; GOMES, J.L.L. *Cultura da Soja*. Viçosa: UFV, 75p, 1989.

SGARBIERI, V.C. *Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações*. São Paulo: Varela, 517 p, 1996,

SILVA, M.T.C.; TURATTI, J.M. Extração de óleo de soja com etanol. *Coletânea ITAL*, Campinas, v.21, n.1, p.73-89, 1991.

SILVA, et al. Effect of germination on oligosaccharide and reducing sugar contents of Brazilian soybean cultivars. *Alimentação e nutrição*, São Paulo, n.2, p.13-19, 1990.

SIQUEIRA, P. F. *Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae*. 2007. 74f. (Dissertação Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SIRTORI, C.R. Risks and benefits of soy phytoestrogens em cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Safety*, v.24, p.665-68, 2001.

STECKELBERG, C. *Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas*. Campinas. (Tese Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 215p, 2001.

STRÖHER, R. *Hidrólise enzimática da proteína do farelo de soja*. Dissertação (Mestrado). Maringá-PR Brasil UEM 2010.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: *a review*. *BioResources* 2 (3), 472–499, 2007.

THANANUNKUL, D. *et al.* Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Jornal of food science*, Chicago, v.41, p173-175, 1976.

TORIJA, M. J.; ROZES,N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J.M.; MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, p. 47-53, 2003.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 28 de abril de 2011.

VIEGAS, M. C. *Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 150p., 2003.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.N.; MACEDO, I.C.; LAHR, D.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

ZAPERLLON, F.; ANDRIETTA, S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. *STAB Açúcar Alcool e Subprodutos*, v.10(4), p.23-28, 1992.

---

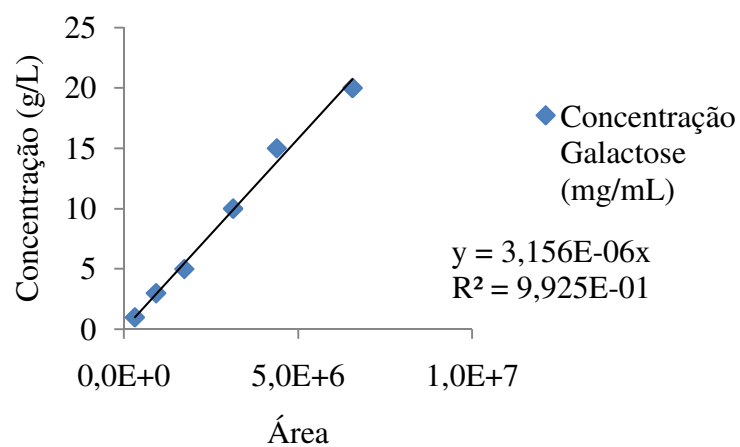
## CAPÍTULO 8

### APÊNDICE A

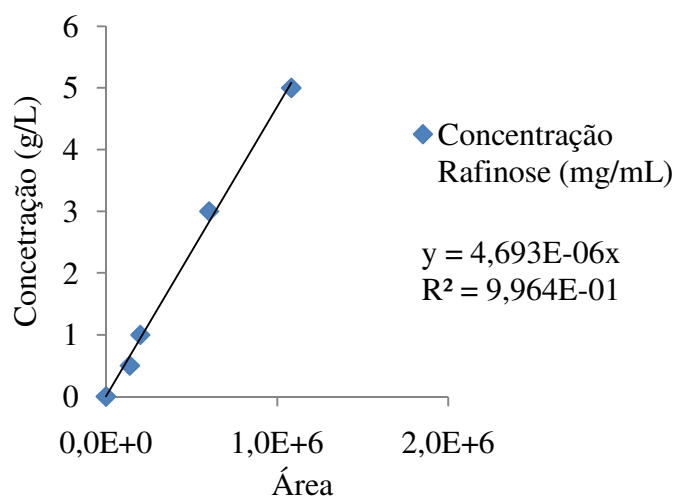
---

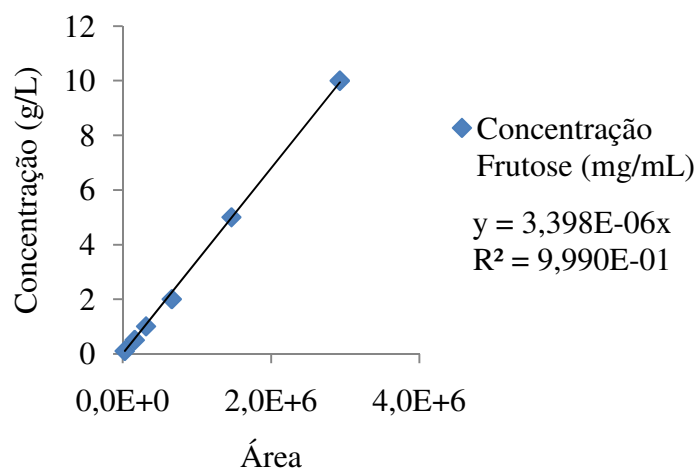
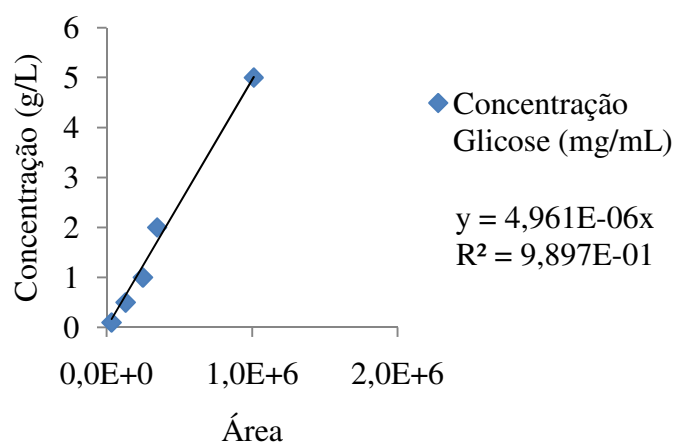
#### CURVAS DE CALIBRAÇÃO

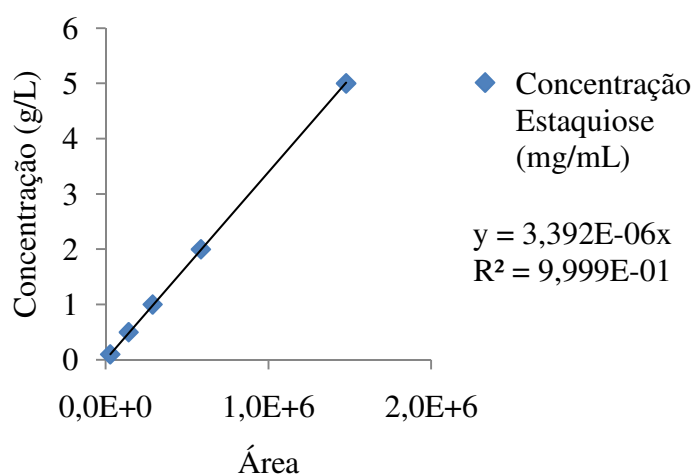
##### A.1 - Curva de calibração para concentração de galactose



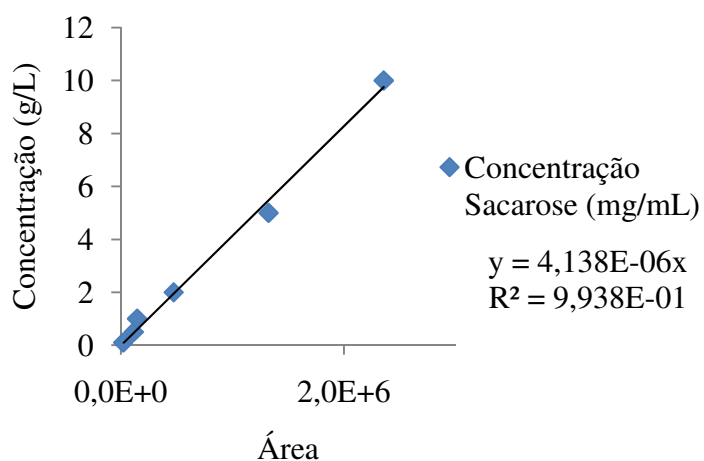
##### A.2 - Curva de calibração para concentração de rafinose



**A.3 - Curva de calibração para concentração de frutose****A.4 - Curva de calibração para concentração de glicose****A.5 - Curva de calibração para concentração de estaquiose**



A.6 - Curva de calibração para concentração de sacarose



A.7 - Curva de calibração para concentração de etanol

