

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC**

**VANESSA LEAL DE QUEIROZ HERMINO**

**Avaliação da Fermentabilidade de Hidrolisados de Sementes do Açaí para a  
Produção de Bioetanol e Ácidos Orgânicos no Contexto de Biorrefinaria de  
Segunda Geração (2G).**

**MANAUS  
2023**

**VANESSA LEAL DE QUEIROZ HERMINO**

**Avaliação da Fermentabilidade de Hidrolisados de Sementes do Açaí para a Produção de Bioetanol e Ácidos Orgânicos no Contexto de Biorrefinaria de Segunda Geração (2G).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Nei Pereira Junior**  
**Co-orientador: Dr. Edson Pablo da Silva**

**MANAUS**  
**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

H554a Hermino, Vanessa Leal de Queiroz  
Avaliação da fermentabilidade de hidrolisados de sementes do  
açai para a produção de bioetanol e ácidos orgânicos no contexto  
de biorrefinaria de segunda geração (2G). / Vanessa Leal de  
Queiroz Hermino . 2024  
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Nei Pereira Junior  
Coorientador: Edson Pablo da Silva  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. açai. 2. ácidos orgânicos. 3. etanol (2G). 4. bioetanol. I. Pereira  
Junior, Nei. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**VANESSA LEAL DE QUEIROZ HERMINO**

**Avaliação da Fermentabilidade de Hidrolisados de Sementes do Açaí para a Produção de Bioetanol e Ácidos Orgânicos no Contexto de Biorrefinaria de Segunda Geração (2G).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

**Aprovado em 10 de Maio de 2024.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Nei Pereira Junior (Orientador) - UFAM**

**Prof. Dr. Edson Pablo da Silva (Co-orientador) - UFAM**

**Profa. Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho (Membro) – UFAM**

**Prof. Dr. Luis Andre Morais Mariuba (Membro) -UFAM**

**MANAUS  
2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado forças para vencer e saúde ao longo desses anos.

Ao meu esposo C. Robson por me incentivar todos os dias, e aguentar e me ajudar em todas as etapas do processo desse trabalho.

A minha mãe e pai F. Leal e José por terem sempre me incentivado a querer algo além do que eles tiveram.

Aos meus irmãos Maressa e Jessé que motivaram a conclusão dessa jornada.

Aos meus pastores Elsom e Cristina que me liberaram das responsabilidades do ofício.

Ainda agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Nei Pereira por aceitar me orientar à distância e o desafio de confiar em alguém que não conhecia, me receber tão bem em seu laboratório no Rio de Janeiro possibilitando assim conseguir realizar esse trabalho. Também aos colegas do LADEBIO que me auxiliaram em todos os processos dos experimentos.

Ao meu gerente prof. Dr. Edson Pablo da Silva, pela disponibilização do laboratório, no Núcleo de Produção de Extratos (NPE/CBA), bem como compartilhar conhecimento, contribuir com ensino e na correção dos trabalhos e através das parcerias auxiliar em alguns ensaios importantes que não tínhamos aqui no laboratório. Aos meus amigos de laboratório: Daniel Motta, Ellen Rocha, e Rayssa Cantisani pelas colaborações nos ensaios, os quais sempre estiveram me apoiando.

Ao Centro de Bionegócios da Amazônia (CBA) e LADEBIO pela concessão do uso dos laboratórios e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

## RESUMO

O processamento de frutas e hortaliças, em geral, gera uma quantidade significativa de resíduos, que frequentemente são descartados no meio ambiente, desperdiçando seu potencial para a obtenção ou desenvolvimento de outros produtos de valor agregado. Dentro deste contexto, a biomassa residual utilizada foi o açaí, obtido do município de Anori, no interior do Amazonas, e submetido a processos de padronização e homogeneização utilizando moinho de martelo com malha de 0,45 mm. O objetivo desse estudo foi valorizar esses resíduos, utilizando-os como substrato para a produção de produtos de alto valor agregado na indústria química, como ácidos orgânicos e biocombustíveis. No primeiro ensaio, utilizado a bactéria *Actinobacillus succinogenes* DSMZ 22257 como inóculo, obteve-se uma concentração de ácidos orgânicos totais de 8,5g/L com hidrolisado de açaí, sob condições específicas de concentração de ácido sulfúrico e tempo de reação. No segundo ensaio, com as mesmas condições, a produção foi de 5,9 g/L de ácidos orgânicos. Para a produção de etanol, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo. O primeiro ensaio resultou em 1,4g/L de etanol, enquanto o segundo, alcançou produções de 6,11; 12,30 e 18,02 g/L de etanol respectivamente. A pesquisa demonstrou que os resíduos de açaí possuem um significativo potencial de valorização quando utilizados como substrato para a produção de ácidos orgânicos e biocombustíveis. O emprego de hidrolisado de açaí evidencia a viabilidade técnica do aproveitamento desses resíduos para sustentabilidade promovendo a economia circular. Portanto, a implementação de tecnologias para o processamento de resíduos de açaí pode converter resíduos em recursos valiosos, beneficiando tanto a economia como o meio ambiente.

**Palavras-chave:** açaí; ácidos orgânicos; etanol (2G), bioetanol.

## ABSTRACT

Fruit and vegetable processing generally generates a significant amount of waste, which is often discarded into the environment, wasting its potential for obtaining or developing other value-added products. In this context, the residual biomass used was açai, obtained from the municipality of Anori, in the interior of Amazonas, and subjected to standardization and homogenization processes using a hammer mill with a 0.45 mm mesh. The objective of this study was to valorize these residues, using them as substrate for the production of high value-added products in the chemical industry, such as organic acids and biofuels. In the first test, using the bacterium *Actinobacillus succinogenes* DSMZ 22257 as inoculum, a total organic acid concentration of 8.5 g/L was obtained with açai hydrolysate, under specific conditions of sulfuric acid concentration and reaction time. In the second test, with the same conditions, the production was 5.9 g/L of organic acids. For ethanol production, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as inoculum. The first test resulted in 1.4 g/L of ethanol, while the second achieved productions of 6.11, 12.30 and 18.02 g/L of ethanol, respectively. The research demonstrated that açai residues have significant potential for valorization when used as a substrate for the production of organic acids and biofuels. The use of açai hydrolysate highlights the technical feasibility of using these residues for sustainability, promoting the circular economy. Therefore, the implementation of technologies for the processing of açai residues can convert waste into valuable resources, benefiting both the economy and the environment.

**Keywords:** Açai; organic acids; ethanol (2G), bioethanol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das regiões produtoras de açaí desenvolvido à partir dos dados do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM).....	19
Figura 2: Utilização de subproduto de açaí em diferentes setores. ....	21
Figura 3: Fórmula estrutural do ácido succínico. ....	24
Figura 4: Fórmula estrutural do ácido Propiônico.....	25
Figura 5: Fórmula estrutural do ácido láctico. ....	26
Figura 6: Relatório de taxa de crescimento anual (CAGR) dos ácidos orgânicos. ....	27
Figura 7: Representação das vias do catabolismo da glicose para ácido succínico e outros metabólitos. Os sobrescritos indicam o número de átomos de carbono por molécula do composto correspondente.....	31
Figura 8: Relatório de taxa de crescimento anual (CAGR) para etanol. ....	32
Figura 9: Esquema da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos. ....	37
Figura 10: Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais (Método da Antrona). ....	43
Figura 11: Curva Padrão de Ácido Gálico.....	44
Figura 12: Fluxograma de esquema das etapas para o processo de fermentação.....	48
Figura 13: Diagrama para o processamento das amostras.....	49
Figura 14: Fluxograma de esquema das etapas para o processo de fermentação.....	53
Figura 15: Resultados visuais das caracterizações lignocelulósicas das sementes de açaí: (A) Resíduo proveniente de despolpamento, (B) Biomassa moída em moinho de martelo, (C) Lignina, (D) Holocelulose e (E) Alfacelulose. ....	54
Figura 16: Cromatograma de perfil de açúcares.....	55
Figura 17: One-Factor Categorical, design geral multinível e categórico de um fator utilizando o software Stat-Ease 360.....	58
Figura 18: Fotomicroscopia da celulose tratada (A), alfacelulose (B) de açaí.....	60
Figura 19: Diagrama de Pareto resultado do Planejamento Experimental do Pré-tratamento Ácido das Sementes de Açaí. ....	64
Figura 20: Superfície de resposta: interação entre (1) concentração de ácido e relação sólido/líquido na produção de manose; (2) interação entre o tempo e a relação sólido/líquido. (3) interação entre a concentração de ácido e tempo. ....	65
Figura 21: Células de <i>A. succinogenes</i> visualizadas em microscópio com aumento de 1000 vezes pela técnica Gram (1); Microscopia eletrônica de varredura da bactéria produtora de ácido orgânicos (2). ....	66
Figura 22: Curva de calibração entre absorvância e peso seco da bactéria <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	67
Figura 23: Cinética de Crescimento de <i>Actinobacillus succinogenes</i> e consumo de manose..	68
Figura 24: Cromatograma da fermentação do hidrolisado ácido das sementes de açaí referente ao ensaio apresentado na Tabela 11. ....	72
Figura 25: Produção de etanol a partir de hidrolisado de sementes de açaí. Inóculo de 17,5 g pu/L (à esquerda) e 35,0 pu/L (à direita).....	75
Figura 26: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \cong 50$ g/L).....	76
Figura 27: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \cong 100$ g/L).....	77
Figura 28: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \cong 150$ g/L).....	77

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Principais fabricantes dos ácidos orgânicos. ....	27
Tabela 2: Variáveis analisadas no planejamento fatorial fracionário e seus respectivos níveis codificados .....	46
Tabela 3: Esquema do programa Estatística do planejamento fatorial.....	47
Tabela 4: Resultados da caracterização físico-química das sementes de açaí.....	55
Tabela 5: Determinação de compostos fenólicos. ....	57
Tabela 6: Análise do perfil de minerais nas sementes de açaí por FRX. ....	58
Tabela 7: Planejamento Fatorial para Meio de Fermentação com Hidrolisado (Matriz de Experimentos). ....	61
Tabela 8: Análise estatística Anova.....	62
Tabela 9: Avaliação da fermentabilidade de manose como substrato por <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	69
Tabela 10: Fermentabilidade do hidrolisado ácido das sementes de açaí na condição que promoveu a maior concentração de manose. ....	72
Tabela 11: Fermentabilidade do hidrolisado de sementes de açaí com duas concentrações de inóculo.....	75
Tabela 12: Variáveis de resposta da fermentação alcoólica de manose em meio quimicamente definido.....	78

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 JUSTIFICATIVA .....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos .....	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
4.1 Resíduos agroindustriais .....	18
4.2 AÇAÍ.....	18
4.2.1 Composição e Valor Nutricional.....	20
4.2.2 Aplicações tecnológicas .....	21
4.2.3 Importância socioeconômica.....	23
4.3. ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	23
4.3.1 Ácido Succínico .....	24
4.3.2. Ácido Propiônico .....	24
4.3.3 Ácido Lático.....	25
4.3.4 Produção.....	26
4.3.5. Cenário Competitivo .....	27
4.3.6. Aplicações dos Ácidos Orgânicos.....	28
4.3.7. Blocos de Construção e Produtos Químicos .....	29
4.3.8. Principais Formas de Obtenção.....	29
4.3.9 Microrganismo Acidogênico Selecionado para Produção de Ácido Orgânico.....	30
4.3.10 Metabolismo do <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	31
4.4. ETANOL .....	32
4.4.1 Produção de Etanol .....	32
4.4.2 Aplicações para Etanol.....	33
4.4.3 Principais Formas de Obtenção.....	34
4.4.4 Microrganismos Produtores .....	36
4.4.5 Bioetanol e Objetivos de Desenvolvimento Sustentável .....	36
4.4.6 Pré-Tratamento.....	36
4.4.7 Métodos de Pré-Tratamento .....	37
4.4.8 Pré-Tratamento com Ácido Diluído.....	39
5 METODOLOGIA.....	40
5.1 Material.....	40
5.2. Microrganismos e Meio de Ativação.....	40

5.3. Caracterização do Material Residual .....	41
5.3.1 Determinação do Teor de Extrativos.....	41
5.3.2 Avaliação do Teor de Lignina.....	41
5.3.3 Avaliação do Teor de Celulose .....	41
5.3.4 Avaliação do Teor de $\alpha$ -celulose.....	42
5.3.5 Avaliação do Teor de Cinzas .....	42
5.3.6 Avaliação do Teor de Umidade.....	42
5.3.7 Potencial Hidrogeniônico (pH) .....	42
5.3.8 Grau Brix e Índice de Refração.....	43
5.3.9 Determinação de Açúcares Solúveis Totais .....	43
5.3.10 Extração de Compostos Fenólicos .....	44
5.3.11 Determinação de Compostos Fenólicos (CF) do Resíduo de Açai.....	44
5.3.12 Avaliação de X-ray Fluorescence (XRF) .....	45
5.3.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
5.4 Avaliação da Utilização de Manose como Fonte de Carbono para o Crescimento de <i>A. succinogenes</i> .....	45
5.4.1. Pré-Inóculo.....	45
5.4.2 Fermentação .....	45
5.5 Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado de Açai como Substrato em Diferentes Estratégias de Condução.....	46
5.5.1. Planejamento Fatorial para Otimização do Pré-Tratamento Ácido .....	46
5.6 Amostragem para Análise.....	48
5.6.1 Determinação de Açúcares Presentes na Amostra .....	49
5.6.2. Determinação da Concentração de Ácidos .....	49
5.6.3. Determinação da Concentração de Etanol .....	50
5.6.4 Observação Microscópica .....	50
5.6.5 Determinação da Curva Padrão para <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	50
5.6.6 Variáveis Respostas .....	51
5.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
5.7 Avaliação da Utilização de Hidrolisado de Açai como Substrato em Diferentes Estratégias de Condução para Produção de Etanol.....	52
5.8 Análise Estatística .....	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
6.1 Resíduo do Açai Utilizado.....	54
6.2 Caracterização Físico-Química do Resíduo.....	54
6.3 Compostos Fenólicos.....	57
6.4 Fluorescência de raios X da amostra in natura (FRX).....	58

6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
6.6.1 Matriz Experimental.....	61
6.6.2 Análise estatística de variância (ANOVA) .....	61
6.6.3 Diagrama de Pareto .....	63
6.6.4 Superfície de Resposta .....	64
6.7 Produção de Ácidos Orgânicos.....	65
6.7.1 Morfologia da Bactéria <i>Actinobacillus succinogenes</i> . .....	65
6.7.2. Curva Padrão entre Concentração Celular (Peso Seco) e Absorvância .....	66
6.7.3. Cinética de Crescimento da bactéria <i>Actinobacillus succinogenes</i> em meio quimicamente definido.....	67
6.7.4 Estudo Preliminar da Fermentabilidade em Meio Quimicamente Definido para Obtenção de Ácidos. ....	69
6.7.5 Estudo Preliminar da Fermentabilidade em Meio Hidrolisado do Resíduo de Açaí..	71
6.8 Produção de Etanol com Base na Fermentabilidade de Manose .....	73
6.8.1 Avaliação preliminar da Fermentabilidade Alcoólica do Hidrolisado Ácido das Sementes do Açaí.....	74
6.8.2 Avaliação da Capacidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Fermentar Manose em meio quimicamente definido.....	76
7. CONCLUSÕES .....	80
8. REFERÊNCIAS .....	82

# 1 INTRODUÇÃO

A exploração sustentável do meio ambiente, introduzindo novas matérias-primas em substituição àquelas já existentes e que são de origem fóssil, como o petróleo, tem sido largamente estudadas, visando a implementação de soluções amigáveis ao meio ambiente e com alto valor agregado (BECKER, 2018). Logo, a utilização de resíduos florestais e/ou subprodutos agroindustriais com a finalidade dessa produção limpa pode vir a ser uma solução extremamente interessante, aonde há o processo de conversão desses resíduos em produtos de base biológica para a indústria em uma economia circular verde (CORREIA *et al.* 2022). Segundo Astrov *et al.* (2022), além das considerações econômicas, existe uma preocupação com a disponibilidade dos recursos naturais, isso demanda o crescimento e o interesse na obtenção de produtos de base biotecnológica.

Algumas biomassas residuais amazônicas se destacam, devido a sua alta produção ao longo do ano e valor biológico, como exemplo, a casca da mandioca e macaxeira que atualmente são utilizadas na alimentação animal (Matte *et al.* 2021); as oleaginosas, como o caroço de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), babaçu (*Attalea speciosa*), andiroba (*Carapa guianensis*) das quais são extraídos óleos (Pereira *et al.*, 2019); o ouriço de castanha (*Bertholletia excelsa*) utilizado na produção de carvão vegetal (Madeira *et al.* 2021); o caroço de bacaba (*Oenocarpus bacaba*) e açaí (*Euterpe oleracea*); além dos subprodutos provenientes do processamento do abacaxi (SOUSA *et al.* 2020). Todos esses materiais têm potencial para serem utilizados como matéria-prima em biorrefinarias de segunda geração, especialmente na produção de bioetanol e ácidos orgânicos.

Neste sentido, o uso de processos biotecnológicos que agreguem valores a recursos da biodiversidade, tem assumido papel preponderante no processo de desenvolvimento econômico. Tan e Lamers (2021), comentam que a bioeconomia recorre a fontes renováveis como matéria-prima ou recursos biológicos, empregando-as nos processos bioquímicos, se tornando possível equilibrar o uso de recursos naturais, utilizando recursos mais sustentáveis.

Embora tenha-se conhecimento sobre o papel da bioeconomia, dos processos biotecnológicos e o quanto estes poderiam impactar diretamente não só no desenvolvimento socioeconômico como também na preservação da biodiversidade, ainda somos extremamente dependentes de recursos fósseis para obtenção de vários produtos com papéis fundamentais em nossas cadeias produtivas, dentre esses, a produção de ácidos orgânicos e etanol de segunda geração (2G).

A principal característica dos ácidos orgânicos (AO) em termos químicos, é a presença do grupo funcional carboxílico ligado a um hidrogênio ou a uma cadeia linear de átomos de carbono (ÁNGEL-ISAZA *et al.* 2019). Estes são amplamente utilizados na indústria de alimentos como aditivos, controle da alcalinidade de produtos, conservantes, agentes antimicrobianos e antioxidantes (MANI-LÓPEZ *et al.* 2012).

Os ácidos orgânicos também têm utilidade importante na indústria de cosméticos, este grupo de substâncias têm sido usados como constituintes da composição de cremes de rejuvenescimento facial. Takkellapati *et al.*, (2018), dirá que a utilização da biomassa oriunda do processamento de vegetais, em biorrefinarias, tem sido apontada como uma alternativa de recurso renovável e mais sustentável para reduzir a dependência do setor de recursos derivados de combustíveis fósseis e mitigar o seu impacto ambiental. Atualmente, sabe-se que a maioria dessa produção, são derivados da indústria petroquímica (ASTROV *et al.* 2022).

A produção de bioetanol de primeira geração (1G) baseia-se numa tecnologia tradicional comprovada mundialmente que utiliza açúcares extraídos diretamente de culturas alimentares com a utilização de leveduras (NARISSETTY *et al.* 2022). O bioetanol de segunda geração (2G) é produzido a partir de biomassa lignocelulósica e, além de melhorar a sustentabilidade das biorrefinarias, não compete com a produção de alimentos. As matérias-primas lignocelulósicas são compostas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Para superar esta estrutura complexa, é necessária uma etapa de pré-processamento para disponibilização desses açúcares (SOARES *et al.* 2022).

Neste cenário, a região amazônica destaca-se por sua biodiversidade, principalmente por sua flora e inúmeras espécies comestíveis, gerando uma quantidade significativa de subprodutos pós-processamento, podendo estes serem utilizados como substrato na produção, por exemplo, de ácidos orgânicos.

As biorrefinarias representam unidades de processamento que se utilizam de materiais de biomassa residual para produzir diversos produtos com valor agregado, dentre eles químicos, combustível e energia (ASSIS *et al.* 2021 e FELIPE *et al.* 2015). Essas instalações, exploraram as fontes de biomassa de maneira integrada, visando a produção de bioenergia, biomateriais e insumos bioquímicos, sendo a produção de ácidos orgânicos uma alternativa extremamente interessante e potencialmente viável tecnicamente, quando comparada às usinas de petróleo que demandam consumo considerável. Além disso, crises políticas como o conflito entre Rússia e Ucrânia resultam em sanções entre países, afetando a economia

global, correndo riscos de inflações altas, o que impacta o preço do petróleo em todo o mundo (ASTROV *et al.*, 2022). Portanto, a biomassa lignocelulósica surge como uma fonte renovável para a produção de produtos químicos.

Dentre os subprodutos agroindustriais mais abundantes na região amazônica e com potencial para serem utilizados como matéria-prima na produção de ácidos orgânicos e etanol de segunda geração, destaca-se o açaí (*Euterpe oleracea Mart.*). O açaí, um fruto nativo, conhecido por seus potenciais benefícios para a saúde devido à sua capacidade antioxidante, e seu valor nutricional, é essencial para a economia, principalmente da região norte, gerando empregos, movimentando a economia, fornecendo alimentos que sustentam a renda da população local (PESSÔA *et al.* 2019). A partir da obtenção da polpa, uma quantidade significativa de resíduos é gerada, os quais podem ser aproveitados como matéria-prima na obtenção de ácidos orgânicos, entre outros compostos de interesse comercial.

Em suma, as inovações biotecnológicas têm se concentrado nas transformações bioquímicas dos processos fermentativos para valorização do resíduo lignocelulósico. O pré-tratamento é a primeira etapa crucial, auxiliando na separação dos componentes celulose, hemicelulose e lignina (TAKKELLAPATI *et al.* 2018). Ácidos orgânicos como succínico, láctico, acético e fórmico tem apresentado resultados promissores quando derivados de fontes biológicas, assim como o bioetanol. Portanto, os esforços para desenvolver um processo eficiente desses compostos tem sido fundamental.

Considera-se o processo de inovação, como uma nova e importante forma de reutilização dos resíduos da Amazônia numa plataforma química (ARUN *et al.*, 2020). Desta forma, surgiu neste contexto, o objetivo geral de caracterizar essa biomassa e definir o melhor processo a ser seguido, visto que não há trabalhos referenciados. Serão abordados os desafios inerentes a esses processos e identificadas variáveis de análise que possibilitem compreender as estratégias adotadas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de utilização do resíduo de açaí oriundo da cadeia produtiva do Amazonas, como fonte de matéria-prima para a produção de ácidos orgânicos e etanol de segunda geração por fermentação. Direcionado nas linhas de pesquisas desenvolvidas nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos – Escola de Química/ UFRJ, sob a orientação do Prof. Dr. Nei Pereira Jr., e no Centro de Biotecnologia da Amazônia sob a coorientação do prof. Dr. Edson Pablo Silva.

## 2 JUSTIFICATIVA

A agregação de valores a insumos amazônicos pode vir a ser uma ação extremamente importante para o desenvolvimento da região, utilizando destes de forma inteligente, a fim de se disponibilizar no mercado produtos de interesse e com alto valor agregado. Sendo assim, o reaproveitamento de biomassa residual de açaí amplamente descartada na região Norte, pode ser vir a ser uma alternativa viável como matéria-prima na indústria química a fim de se obter ácidos orgânicos e etanol de 2G via processo de fermentação, diminuindo a dependência do petróleo e substituindo os tradicionais processos de produção. As cepas de *Actinobacillus succinogenes* consomem açúcares C6 e C5 na produção de ácidos, utilizando totalmente todas as frações hemicelulósicas. Considerando a crescente busca por alternativas sustentáveis na produção de biocombustíveis, o etanol surge como uma opção viável e estabelecida, podendo ser obtido a partir de açúcares mediante um processo usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, uma oportunidade ainda pouco explorada reside na utilização de resíduos do processamento das sementes de açaí como biomassa para essa finalidade. Esses resíduos são ricos em nutrientes, representam uma valiosa fonte de matéria-prima com potencial.

Diante desse contexto, a investigação da viabilidade dessas biomassas como substrato em processos de fermentação para obtenção de moléculas específicas, torna-se uma alternativa promissora. Essa abordagem não apenas reduziria o descarte de resíduos orgânicos no ambiente, mas também adicionaria valor a materiais que, de outra forma, seriam desperdiçados.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Aproveitamento dos resíduos de Açaí (*Euterpe oleracea*) oriundos da cadeia produtiva do Amazonas como fonte de matéria-prima para produção de ácidos orgânicos utilizando a bactéria *Actinobacillus succinogenes* DSMZ 22257 e de etanol de 2ª Geração usando levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial.

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Ativar a cultura de *Actinobacillus succinogenes* DSM 22257;
2. Caracterizar o resíduo oriundo do processamento do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.);
3. Avaliar a capacidade da bactéria produtora de ácidos orgânicos em consumir manose (principal açúcar de hidrolisados da semente do açaí) em meio quimicamente definido;
4. Otimizar o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, empregando a técnica do Planejamento Experimental Fatorial Simples;
5. Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado ácido das sementes do açaí visando a produção de ácidos orgânicos;
6. Realizar fermentação em meio quimicamente definido com elevadas concentrações de manose visando a produção de etanol.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Frutas e hortaliças são fontes de nutrientes e vitaminas essenciais ao metabolismo humano (WALLACE *et al.* 2020). Estas podem ser utilizadas em sua forma *in natura* ou processada, levando a geração de subprodutos ou coprodutos (NIETO *et al.* 2021). O bioma amazônico é conhecido por sua rica biodiversidade, especialmente por sua flora (De Las Casas, 2019). Dentre suas variedades, é importante destacar que o açaí tem sido frequentemente utilizado para obter polpas e/ou outros produtos, como o chamado “vinho de açaí” (DA SILVA *et al.* 2021), frozen e polpas congeladas Carvalho *et al.* (2017), sendo que todas essas formas de uso geram uma grande quantidade de resíduos/rejeitos (SANTOS *et al.* 2020).

O uso desses resíduos provenientes do setor agroindustrial é de grande interesse e relevância para a biotecnologia, principalmente para a Amazônia e seu ecossistema, uma vez que não dependem de expansão territorial, dando destinações adequadas e de alto valor agregado à biomassa residual oriunda do processamento, dando agregação de valores desses resíduos.

### 4.1 Resíduos Agroindustriais

Os processamentos das matérias-primas agroindustriais, oriundo das cadeias produtivas, seja da Amazônia, ou de qualquer outra localidade, geram toneladas de resíduos orgânicos (CORREA *et al.* 2019). Tais resíduos são constituídos de diversas composições, minerais, químicas, bioquímica, que podem ser reaproveitadas em outras aplicações, garantindo uma fonte alternativa e trazendo vantagem econômica e social para os produtores. Segundo Maia *et al.*, (2022) e Oliveira *et al.*, (2021), essas biomassas residuais amazônicas podem ser deslocadas à posição de valiosas matérias-primas para a obtenção de produtos de valor agregado, o que está em consonância com os princípios da economia circular.

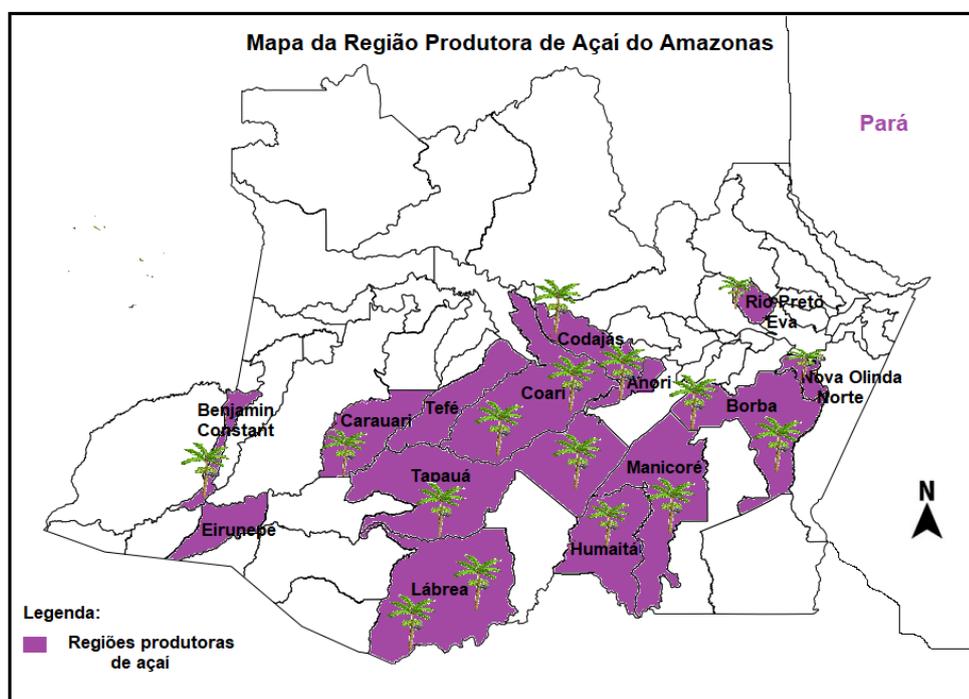
### 4.2 AÇAÍ

O açaí (*Euterpe sp.*) é um fruto proveniente do açazeiro, uma palmeira pertencente à família Aracaceae, medindo 3 a 20 m de altura, com picos de produção de julho a dezembro (LIRA *et al.* 2021). Sua cultura é de extrema importância para o setor alimentício, apresentando utilidades significativas na indústria farmacêutica e cosmética, passando de

alimento básico local e regional da Amazônia brasileira para um alimento de moda internacional, assumindo diferentes valores (nutricionais, simbólicos e econômicos) através de sua cadeia de commodities (BARBOSA E CARVALHO JUNIOR, 2022) e (SIQUEIRA e BRONDIZIO, 2011).

Da produção nacional, a região Norte corresponde a 87,5% do total, o estado do Amazonas ocupa a segunda posição no ranking de produção no Brasil, com participação de 21,39% CONAB (2019), sendo o município de Codajás o maior produtor estadual. Nesta atividade, predomina o extrativismo, embora, nos últimos anos, observa-se, um aumento significativo das áreas cultivadas, devido ao fácil acesso aos diferentes mercados consumidores, bem como pela sua importância para a segurança alimentar e nutricional. No estado do Amazonas, o açaí é cultivado por mais de 4 mil agricultores familiares e empresários, com cultivos extensos em alguns municípios. As maiores produções de açaí de 2019 a 2022, abrangem os municípios de Codajás, Borba, Eirunepé, Tefé, Anori, Manicoré, Coari, Rio Preto da Eva, Carauari, Humaitá, Lábrea, Tapauá, Nova Olinda do Norte e Benjamin Constant com a produção do açaí Nativo 38.000 mil toneladas e açaí Cultivo 35.930 mil toneladas (IDAM., 2020), conforme mapa da região produtora.

Figura 1: Mapa das regiões produtoras de açaí desenvolvido à partir dos dados do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM).



A safra do açaí tem sido crescente ao longo dos últimos anos, com incremento significativo de receitas. Segundo Pessôa et al., (2019) e dados do relatório de Produção agrícola (IBGE, 2017), a safra agrícola nacional de açaí de 2016 a 2017 foi de 219,885 toneladas, aumento de 2% em relação ao ano anterior, gerando R\$ 596,8 milhões em receita.

Da região Norte, o Pará se destaca, com 61,2% da safra total nacional (CONAB 2019). Tal elevação na produção, reflete diretamente na geração de subprodutos, que se descartam inadequadamente e/ou subutilizados. De acordo com Sato et al., (2019), o caroço representa até 85% do peso do fruto, ou seja, para cada 100 toneladas de açaí, 80 t são de resíduos. Estima-se que mais de 1.000.000 toneladas de sementes sejam produzidas anualmente e descartadas em locais inadequados, desperdício que poderia ser evitado se aproveitassem as características físicas, químicas e nutricionais presentes nesses subprodutos.

#### **4.2.1 Composição e Valor Nutricional**

É válido salientar que acerca dos resíduos oriundos do processamento de vegetais, o mesmo está relacionado com a sua composição nutricional, que pode ser igual ou até mesmo superior a partes comumente utilizadas (SILVA *et al.* 2016). Segundo Ferreira Monteiro *et al.* (2019) as sementes de açaí, são ricas em manana, e que após hidrólise podem ser convertidas em manose, glicose e outros monossacarídeos. No trabalho de Ferreira Monteiro *et al.* (2019), a composição majoritária das amostras moídas, em relação à fração carboidratos, revelou a predominância de manana, correspondente a 52,46% do seu peso seco total, e quantidades menores de outros glicídios estruturais também foram identificadas, como 8,40% glicose, 2,05% xilose, 1,51% galactose e 0,63% arabinose. A manose é comercializada como um suplemento dietético, utilizada para melhorar a textura de alimentos como sorvetes, frutas cristalizadas e molhos para saladas (HU *et al.* 2016).

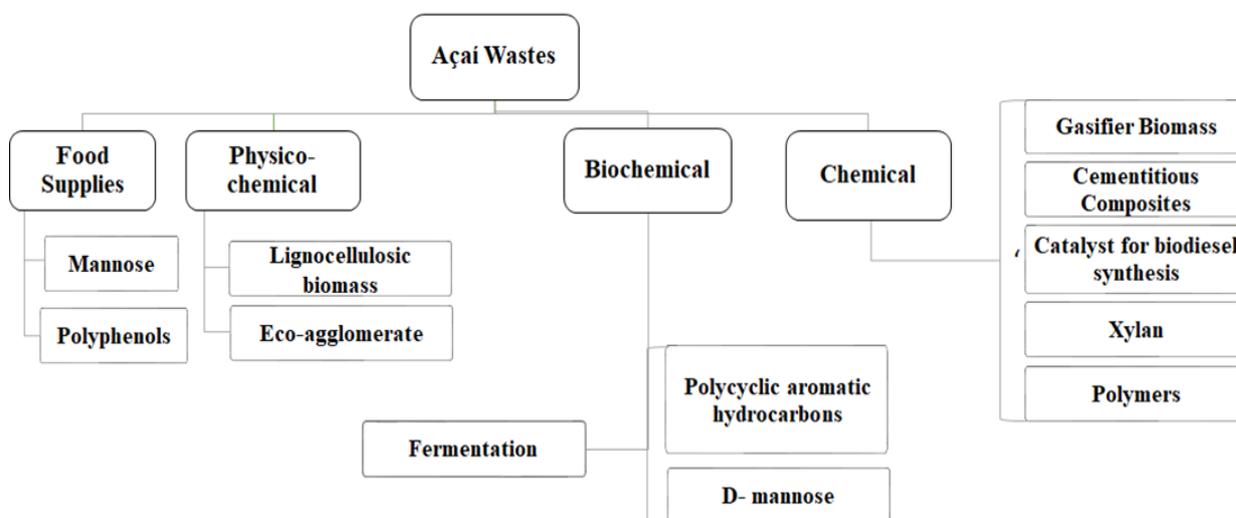
Segundo Barros e Pessoa Jr. *et al.*, (2021), as sementes de açaí contêm cerca de 4,48% de extrativos, valores estes que podem ser variáveis, dependendo da espécie, entressafra e localidade. Barbosa e Carvalho Junior (2022) e Ferreira Monteiro *et al.* (2019) quantificaram valores de aproximadamente 9,89% de extrativos em açaí seus trabalhos. Estes componentes são removidos por meio de extrações com solventes, os principais extrativos das sementes de açaí são os polifenóis, principalmente os taninos condensados (proantocianidinas) que se diferem em seus monômeros constitutivos (flavan-3-óis) como catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina (BARBOSA E CARVALHO JUNIOR, 2022).

## 4.2.2 Aplicações Tecnológicas

Algumas alternativas de aproveitamento dos resíduos gerados do processamento do açaí tem sido estudadas, entretanto, poucas soluções com capacidade operacional (BARBOSA e CARVALHO JUNIOR (2022)). As iniciativas exploradas, para uso mais tradicionais, são a produção de insumos alimentares. Outras podem ser executadas como a produção de manose e polifenóis.

As tendências em sustentabilidade ambiental mostram que os processos tradicionais estão dando uma nova cara a de geração de valor nos produtos alimentícios, e em outras áreas de atuação como a físico-química, bioquímica e química, trazendo vantagem competitiva. A figura 2 traz as diversas possibilidades de utilização dos subprodutos do açaí nos diversos nichos tecnológicos e áreas, podendo ser uma matéria-prima multifuncional, isso devido principalmente às suas características físicas, químicas e nutricionais.

Figura 2: Utilização de subproduto de açaí em diferentes setores.



Diante da busca por soluções sustentáveis para o resíduo da semente do açaí, a aplicação em insumos alimentares representa uma nova vertente para sua cadeia produtiva. Este direcionamento visa não apenas reduzir o descarte de resíduo, mas também aproveitar esses resíduos para produção de insumos à base de polifenóis e manose (BARBOSA; CARVALHO JUNIOR 2022).

Em termos físico-químicos, os resíduos de açaí podem ser empregados como biomassas lignocelulósicas, apresentando rendimentos de massa e as características físico-

químicas dos derivados lignocelulósicos. Estudos indicam um rendimento de cerca de 64% do CNC tipo I, com 45% de grau de cristalinidade. A lignina extraída é rica em grupos metoxil, álcool *p*-cumarílico e ácido *p*-cumárico (LINAN *et al.*, 2021).

Na área de Eco-aglomerados, os painéis de partículas lignocelulósicas passam por mercerização química para remoção do SiO<sub>2</sub> e da formação de protuberâncias globulares, resultando em uma superfície da fibra mais rugosa. Isso facilita a aderência entre as fibras e a resina de poliuretano à base de mamona, melhorando as propriedades físicas (absorção de água e intumescência em espessura), e mecânicas (módulo de ruptura, colagem e retirada de parafuso (DE LIMA MESQUITA *et al.* 2018).

Em termos bioquímicos, os resíduos de açaí podem ser utilizados na extração e produção verde de D-manose. A manana, principal componente das sementes maduras, pode ser obtida através da hidrólise ácida e catálise enzimática do hidrolisado residual. Aproximadamente 50% do peso seco total e 80% dos carboidratos totais das sementes são compostos pela manana. Estudos indicam que a hidrólise ácida a 3% de ácido sulfúrico, a 121°C por 60 min, pode resultar em cerca de 41 g/L de manose, com um rendimento aproximadamente de 30%. A hidrólise enzimática dos 70% restantes da manana nas sementes pode aumentar a concentração de manose para 146,3 g/L, com um rendimento de até 96,8%, tornando a extração de manose de resíduos vegetais uma alternativa viável (WANG, P. *et al.* 2022 e ZHANG *et al.* 2009).

Outra aplicação bioquímica é absorção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em resíduos lignocelulósicos por meio de tratamento enzimático. Os (HAPs) representam uma importante classe de carcinógenos (agentes químicos, físicos ou biológicos que podem causar câncer), que estão presentes como contaminantes em diversas fontes agroalimentares. O pré-tratamento enzimático da lignina aumenta a disponibilidade dos grupos funcionais da lignina por despolimerização enzimática para aumentar a capacidade de adsorção dos HAPs (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Nas aplicações químicas incluem o uso de resíduos de açaí como biomassa em gaseificadores para geração de energia. O carvão ativado resultante empregado como um adsorvente de azul de metileno em águas residuais têxteis brutas (PESSÔA *et al.*, 2019). Em compósitos cimentícios para aplicações em argamassas de revestimento de paredes e reforço de pequenos pontos estruturais, após tratamento alcalino (DE AZEVEDO *et al.* 2021).

Os resíduos de açaí também podem ser utilizados como catalisador para síntese de biodiesel, a atividade catalítica tem alto teor de óxidos metálicos e carbonatos com sítios

básicos de superfície, tornando-os altamente eficientes, mostrando sua atividade em teor de éster acima de 92,5% (MARES *et al.* 2021). Na produção de xilana com aplicações industriais e biomédicas, o resíduo desengordurado submetido a extração sucessiva com água quente e 10% aq. KOH. Os polissacarídeos extraídos com solução alcalina recuperados por diálise, com um rendimento de 5,9%. Seguido de um tratamento de congelamento-descongelamento, que após centrifugação deu origem a uma fração solúvel em água fria e insolúvel em água fria (rendimento de 4,2%). A composição de monossacarídeos da fração insolúvel em água fria apresentou principalmente xilose (97,2%) e pequenas quantidades de ácidos urônicos (2,8%), indicando a presença de uma xilana nesta fração (CANTU-JUNGLES *et al.* 2017).

Os resíduos de açaí podem ser aproveitados como uma alternativa no processamento de PP (polipropileno) e PEAI (poliestireno de alto impacto). A incorporação da fibra nos compósitos pode oferecer aumento significativo na resistência ao impacto de ambos os polímeros, indicando uma nova abordagem para fortalecer termoplásticos e uma alternativa inovadora para o reprocessamento de PP e HIPS utilizados (DA COSTA CASTRO *et al.* 2010).

#### **4.2.3 Importância Socioeconômica**

A utilização eficiente do resíduo de açaí segundo Jorge (2020), pode ter um impacto significativo na região, especialmente se adotar o conceito de biorrefinaria para explorar de forma mais abrangente as características da biomassa. Além das práticas tradicionais que são adequadas e pertinentes como a compostagem e adubos orgânicos. Barbosa e Carvalho Junior (2022) sugerem atividade com foco na produção de manose, e coprodutos polifenóis e xarope de açúcar, destaca-se como uma atividade com uma oportunidade de negócio promissora. Estima-se que um investimento líquido de US\$ 64,2 milhões para construção e operação de uma biorrefinaria de resíduos de açaí, visando a produção de manose poderia resultar em uma receita anual de 74,7% e um lucro líquido de US\$ 31,4 milhões por ano (Jorge 2020). Tal investimento traria benefícios socioeconômicos para região, fortalecendo a cadeia produtiva do açaí, dando valor agregado a esse subproduto que é descartado. Além disso, a produção de etanol ou ácidos orgânicos seria um benefício adicional desse empreendimento, contribuindo para o desenvolvimento local.

### **4.3. ÁCIDOS ORGÂNICOS**

Os ácidos orgânicos são compostos químicos que possuem um ou mais grupos

carboxila (COOH) ligados a uma cadeia de carbono. Eles são amplamente encontrados na natureza e desempenham papéis essenciais em diversos processos biológicos, industriais e ambientais (NELSON e COX 2019). Esses compostos são caracterizados por sua capacidade de doar prótons (íons  $H^+$ ) em solução aquosa, o que os torna ácidos de acordo com a teoria de (BRØNSTED, e J. N.; LOWRY 1923). Os ácidos orgânicos desempenham um papel fundamental na indústria de processamento, podendo ser encontrado na forma de sais com características ácidas (SHELTON, 1963). Razaghpour *et al.* (2022) destacam sua ocorrência natural em frutas e vegetais, citando como exemplos o ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, além do ácido láctico que surge durante a fermentação do leite.

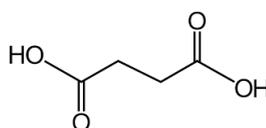
Além desses ácidos mencionados anteriormente, outros ácidos orgânicos desempenham papéis importantes em diversos processos industriais e biológicos como o succínico, propiônico e láctico.

#### 4.3.1 Ácido Succínico

O ácido succínico é um ácido dicarboxílico (C-4) que é considerado um dos produtos químicos mais promissores porque fornece alternativas sustentáveis (produzido a partir de fontes renováveis via fermentação), apresentando desempenho competitivo em comparação as rotas petroquímicas (ALEXANDRI *et al.*, 2017 e LI *et al.* 2011). É um importante bloco de construção ou precursor de várias commodities químicas, suas várias aplicações nas indústrias farmacêutica, agrícola, alimentícia e química. O desenvolvimento de ácido succínico de base biológica é atualmente considerado o mercado que mais cresce na bioeconomia (FILIPPI *et al.*, 2021). Também conhecido como ácido butanodióico, é um ácido dicarboxílico, sua estrutura química, é representada por  $C_4H_6O_4$  (LO *et al.*, 2020).

O método químico é mais barato que o método de base biológica, no entanto, ele depende muito de substratos de petróleo não renováveis, conseqüentemente o preço flutua muito (YANG *et al.*, 2020).

Figura 3: Fórmula estrutural do ácido succínico.



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

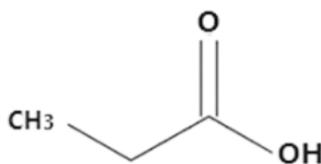
#### 4.3.2. Ácido Propiônico

O ácido Propiônico é um componente químico à base de C3, com fórmula química

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ , (Fig. 4) é um líquido incolor e com odor desagradável (Castro et al. 2021). Também seu nome oficial é baseado em IUPAC que é um ácido monocarboxílico, de cadeia saturada e aberta. É convertível em um sal chamado propionato. Seu nome do grego *protos* = primeiro e *pion* = gordura, decorre porque é o menor ácido com propriedades de ácidos graxos. Quando em estado líquido puro transparente, pode ser corrosivo, com cheiro levemente adocicado (Castro 2014).

A utilização de ácido propiônico em rações animais e como conservantes de alimentos representa aproximadamente 66% de sua demanda, enquanto na síntese de herbicidas por 19%. Na síntese de propionato de acetato de celulose responde por cerca de 11% de seu uso, e outras aplicações, como intermediários, compreendem aproximadamente de 4% (Liu et al. 2012).

Figura 4: Fórmula estrutural do ácido Propiônico.

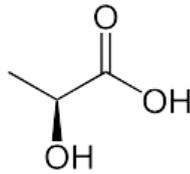


Fonte: Castro (2014).

### 4.3.3 Ácido Láctico

O ácido láctico é tradicionalmente obtido mediante processos de fermentação (principalmente) ou por meio de síntese química, este tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética, têxtil, química e farmacêutica (FU et al. 2023). O ácido láctico possui isômeros óticos: ácido L-láctico e ácido D-láctico, que podem ser produzidos por síntese química (ácido DL-láctico) ou fermentação microbiana (ácido L-láctico, ácido D-láctico ou ácido DL-láctico). O processo de fermentação microbiana utiliza condição amenas de produção com baixo consumo de energia. As bactérias lácticas podem produzir ácido láctico degradando o açúcar por meio de homofermentação ou heterofermentação (WISCHRAL et al. 2019). Durante o processo de crescimento anaeróbico de bactérias lácticas homofermentativas obrigatórias, no caso de excesso de substrato, fontes de energia como a glicose são convertidas em piruvato através da via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP-P), e o piruvato é, subsequentemente, metabolizado em ácido láctico (BUSTOS et al. 2005).

Figura 5: Fórmula estrutural do ácido láctico.



**Fonte:** Carolina Salgado de Oliveira; Vilela Borges (2020).

#### 4.3.4 Produção

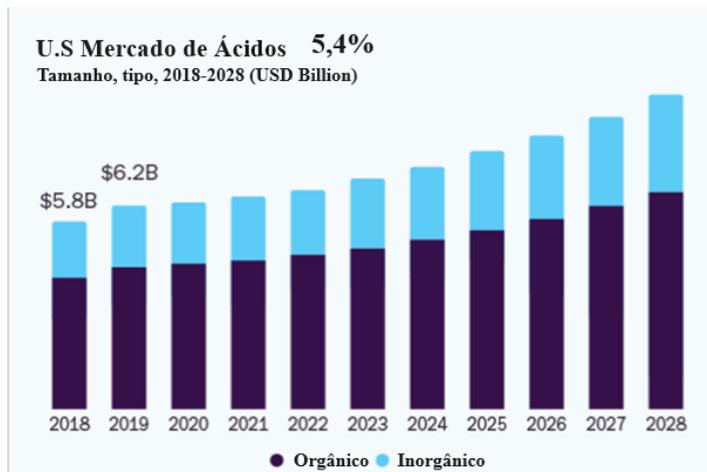
A produção de ácidos por rota bioquímica constitui uma alternativa valiosa, cujo processo de produção envolve conversão dos açúcares fermentáveis. Através de pesquisas relacionadas ao tema, não se encontrou trabalhos da produção de ácidos orgânicos por meio de hidrólise de material pré-tratado de açaí, o estudo preliminar deste trabalho visa avaliar essa possibilidade.

Para Wang *et al.* (2018) a produção por rota bioquímica, embora, com parâmetros técnicos comparáveis a rota petroquímica, ainda é mais onerosa, dependendo do ácido. Exceção é a produção de ácido láctico que é majoritariamente produzido por fermentação. Assim, para reduzir os custos, as biomassas estão sendo investigadas para a produção via fermentação de açúcares simples.

O desenvolvimento de bioprocessos neste trabalho, de forma geral, foi direcionado para a produção de produtos químicos de base biológica, utilizando resíduos da cadeia de abastecimento alimentar, devendo esse ser considerado associado à extração de componentes de valor agregado de resíduos agroindustriais.

A avaliação de crescimento do mercado global de ácidos orgânicos em 2020 foi de US\$ 6,3 Bilhões, registrando um crescimento anual de 0,5% a.a. desde 2018, mesmo durante pandemia de Covid-19. Com a situação se estabilizando, dados recentes da (Grandviewresearch, 2019) (Figura 6) estimam uma expansão da taxa de crescimento anual composta por (CAGR) de 5,4% entre 2020 e 2028, devido a presença de vários produtos no mercado e sua expectativa de um crescimento exponencial da demanda.

Figura 6: Relatório de taxa de crescimento anual (CAGR) dos ácidos orgânicos.



Fonte: Grandviewresearch (2019).

Os ácidos orgânicos encontram aplicação como insumos nas indústrias de alimentos, bebidas, agricultura, farmacêutico, estando o mercado desses ácidos bem estabelecidos.

#### 4.3.5. Cenário Competitivo

Os principais fabricantes no mercado de ácido ácidos orgânicos incluem portfólio diversificado de produtos, ampla gama de aplicações e suporte técnico aos clientes são fatores que fortalecem a posição dessas empresas no mercado. Também emprega várias estratégias de crescimento, como parcerias, contratos e expansões para fortalecer sua posição atual no mercado (MODORINTELLIGENCE, 2021). Algumas dessas empresas estão listados na tabela 1:

Tabela 1: Principais fabricantes dos ácidos orgânicos.

<b>FABRICANTES</b>
<b>Grupo Polint</b>
<b>Cargill Inc.</b>
<b>BASF SE</b>
<b>Archer Daniels Midland (ADM)</b>
<b>PVS Química Inc.</b>
<b>Química Geral EUA</b>

Fonte: Grandviewresearch (2019).

#### 4.3.6. Aplicações dos Ácidos Orgânicos

Estas substâncias possuem grupos funcionais de ácido carboxílico, tornando-se produtos químicos importantes para a produção de vários outros compostos como: ácidos graxos, lipídios e polímeros biodegradáveis (XU *et al.* 2018).

A mudança de hábito dos consumidores que buscam cada vez mais por produtos alternativos para o cuidado da pele, bem como na indústria de alimentos e bebidas, a busca incessante por inovações com o intuito de capturar esse crescente mercado consumidor.

Suas aplicações comerciais encontram vários nichos de mercado, como aplicações: médicas. A presença de grupos carboxila confere hidrofiliabilidade à molécula, o que significa que ao utilizar ácidos orgânicos, os grupos carboxila podem facilmente participar da formação de ligações de hidrogênio, que é a fonte da formação de solventes utilizados em alguns medicamentos. Além disso, a sua aplicação na biomedicina como agentes antimicrobianos e intensificadores de liberação de fármacos, amplia seu potencial como produtos farmacêuticos ou agentes antimicrobianos (SWEBOCKI *et al.* 2023).

Alguns solventes eutéticos profundos (DES) são sintetizados usando biomoléculas naturais (carboidratos, ácidos carboxílicos etc.). Um bom exemplo é uma mistura de ácido málico, água, prolina e ácido láctico, que aumenta a solubilidade da berberina (um medicamento anti-inflamatório e antibacteriano) (WIKENE *et al.* 2015). Outro exemplo de ácido orgânico interagindo com uma proteína é o ácido isobutilfenilpropanol, também conhecido como ibuprofeno (MAZALEUSKAYA *et al.* 2015). Também outra proteína relacionada ao Nitroimidazol (ácido láctico) (Leiros *et al.*, 2004), além disso, o ácido oxálico é usado para transportar biomoléculas como anticorpos monoclonais. Estudos sobre a eficácia de misturas de cloreto de colina e ácido glicólico demonstraram que estes anticorpos específicos são atualmente utilizados no tratamento do câncer (SWEBOCKI *et al.* 2023).

Em aplicações alimentícias, o ácido succínico é utilizado como acidulante e intensificador de sabor em alimentos, por exemplo, como condimentos, bebidas e salsichas (MANCINI *et al.* 2022). Algumas medidas de controle implementadas para reduzir a contaminação dos rebanhos de aves nas granjas incluem acidificação da ração de frangos, como uso do ácido láctico (BAI *et al.* 2022).

Outro emprego industrial de base polimérica, é o uso do ácido láctico para embalagens, filamentos poliméricos para fabricação do PLA, material biodegradável (Suganthi *et al.* 2020). Assim também o ácido succínico, como 1,4-butanodiol, succinato de

polibuteno, resinas alquídicas e plastificantes, impulsionem o crescimento futuro do mercado de polímeros (XU *et al.*, 2018).

#### **4.3.7. Blocos de Construção e Produtos Químicos**

As operações de multiprodutos têm que ter flexibilidade para se adaptar às situações de mercado em constante mudança de matérias-primas e produtos, oferecendo condições técnicas dos processos de fermentação e operação de utilidade flexível. Neste sentido, uma das principais considerações para o desenvolvimento de novas tecnologias que pode ser utilizado para a produção de novos produtos químicos é o conceito de blocos de construção de plataforma. Este conceito é baseado no fato de que um único bloco de construção tem o potencial de criar um número significativo de produto acabado.

Na seleção dos ácidos orgânicos que seriam descritos como blocos de construção, uma equipe do Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) e NREL apresentou uma lista de 30 candidatos potenciais foi selecionada usando um processo de revisão baseado no modelo petroquímico de blocos de construção, dados químicos conhecidos, propriedades, foi reduzida para 12 potenciais produtos químicos de base biológica (KAMM *et al.*, 2008).

Segundo Chen *et al.*, (2021) os produtos químicos de bloco relatados podem ser produzidos a partir do açúcar por processos biológicos e conversões químicas considerados são moléculas com múltiplos grupos funcionais com o potencial de ser transformado em novas famílias de moléculas úteis. O doze blocos de construção à base de açúcar são 1,4-diácidos (succínicos, fumáricos e málicos), ácido 2,5-furanodicarboxílico, ácido 3-hidroxipropiônico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutâmico, ácido itacônico, ácido levulínico, 3-hidroxibutirolactona, glicerol, sorbitol e xilitol/arabinitol (KAMM *et al.*, 2008).

Um grupo de blocos de construção de segundo nível também foi identificado como candidatos viáveis. Estes incluem ácido glucônico, ácido láctico, ácido malônico, ácido propiônico, os triácidos cítrico e aconítico, ácido xilônico, acetoína, furfural, levoglucosan, lisina, serina e treonina (KAMM *et al.*, 2014).

#### **4.3.8. Principais Formas de Obtenção**

##### **4.3.8.1. Rota Química**

Atualmente, a maioria da produção comercial é resultado da síntese química envolvendo a hidrólise de derivados de petróleo, que está associada a um processo prejudicial

ao meio ambiente que produz algum grau de poluição (BARLETTA *et al.*, 2022).

#### **4.3.8.2 Rota Fermentativa**

Devido a preocupações com o impacto econômico e ambiental, a atenção voltou-se para a produção de ácidos orgânicos por fermentação microbiana, a produção com este tipo de biomassa residual em vez de meios de culturas (BELLO *et al.*, 2022).

Os produtos de base biológica são produzidos por diferentes métodos e processos (físicos, químicos, biológicos e quente), para este fim, é necessário conhecimento em biorrefinaria estabelecendo uma base tecnológica (BELLO *et al.* 2022).

Existem vários processos de fermentação para a produção de ácidos orgânicos, o que difere são: tipos de fermentação e os microrganismos utilizados. Esses processos podem ser realizados em meios líquidos ou sólidos, podendo também ser utilizadas leveduras, bactérias e fungos filamentosos (MORAES, 2019).

O processo de fermentação pode ser realizado de três formas: batelada simples, alimentada ou contínua. As principais diferenças desses processos são: o tipo de fermentação e os microrganismos utilizados. Esses processos podem ser realizados em superfícies (líquidas ou sólidas), podendo também ser utilizadas leveduras, bactérias ou fungos (MORAES, 2019). O processo de fermentação pode ser realizado de três formas: batelada simples, alimentada ou contínua (PEREIRA *et al.*, 2008).

A fermentação está se tornando cada vez mais parte integrante do desenvolvimento de novos produtos com alto valor agregado e está substituindo as rotas tradicionais para a produção de importantes produtos químicos.

#### **4.3.9 Microrganismo Acidogênico Selecionado para Produção de Ácido Orgânico**

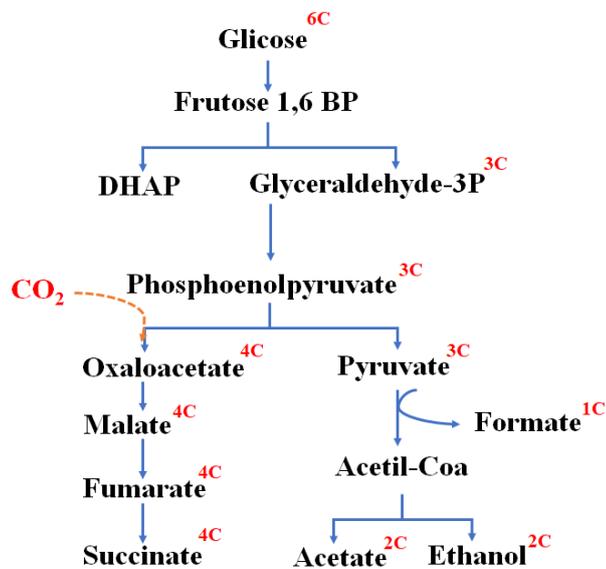
A produção microbiana de ácido orgânico a partir de matéria-prima renovável, é de grande importância para o desenvolvimento sustentável, devido ao seu enorme potencial econômico. Para produção de ácido será utilizada a bactéria *Actinobacillus succinogenes* do banco alemão DSMZ. Estudos recentes demonstraram que a glicose, xilose e arabinose podem ser metabolizadas de forma simultânea, o que pode aumentar a conversão de substrato e, conseqüentemente, melhorar a economia ao utilizar biomassa lignocelulósica como fonte de carbono (Ferone et al. 2018 e Wang, J. et al. 2022). O crescimento requer um controle regular do pH devido aos efeitos inibitórios de subprodutos como ácidos acético e fórmico, furfural e 5-hidroximetilfurfural durante a fermentação. A concentração de succinato é influenciada

pelo efeito sinérgico de uma mistura de açúcares, alguns dos quais são metabolizados simultaneamente para fornecer energia e/ou intermediários para consumo de outros açúcares.

#### 4.3.10 Metabolismo do *Actinobacillus succinogenes*

Várias cepas de bactérias e leveduras são conhecidas por fermentar a glicose celulósica em ácidos e outros produtos químicos e biocombustíveis (Borges (2011)). Na presença de CO<sub>2</sub>, a atividade da fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinase aumenta, convertendo a PEP em oxaloacetato e posteriormente em succinato. Na ausência de CO<sub>2</sub>, a PEP é convertida em piruvato e depois em formato, acetato e etanol pela atividade da piruvato quinase Lo et al. (2020). *A. succinogenes* pode crescer em uma variedade de fontes de carbono, incluindo xilose, glicerol, sacarose e celobiose. Embora cepas de *Actinobacillus succinogenes* produzam anaerobicamente misturas de ácidos orgânicos após exposição ao CO<sub>2</sub>, conforme figura 7, em ambientes enriquecidos seu metabolismo favorece a formação de ácido succínico porque o gliceraldeído derivado da glicose (molécula de 3 carbonos) é convertido em AS pela adição de CO<sub>2</sub> (Lo et al. (2020)).

Figura 7: Representação das vias do catabolismo da glicose para ácido succínico e outros metabólitos. Os sobrescritos indicam o número de átomos de carbono por molécula do composto correspondente.



Fonte: Lo et al. (2020).

## 4.4. ETANOL

O bioetanol é um biocombustível que pode ser produzido a partir de diferentes biomassas: sacaríneas, amiláceas e lignocelulósicas. As duas primeiras são consideradas tecnologias maduras e são utilizadas no Brasil e nos Estados Unidos da América que juntos são responsáveis por 85% da produção mundial desse biocombustível. As biomassas lignocelulósicas incluem resíduos da agroindústria como bagaço e palha de cana, palha de arroz, palha de milho e palha de trigo (PEREIRA *et al.* 2021). Neste sentido, o bioetanol é uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis. A produção de etanol a partir de açúcares C6 é um processo bem estabelecido usado mundialmente para produzir etanol 1G utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentativo (PEREZ *et al.* 2022).

### 4.4.1 Produção de Etanol

O etanol 2G, também conhecido como bioetanol, normalmente podem ser produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos, como cana-de-açúcar, sorgo sacarino, milho (Iram *et al.* 2022). A demanda por etanol é atribuída ao aumento da produção em todo o mundo. Comercialmente, são produzidos a partir de carboidratos como glicose, amido e sacarose, são alguns mais comumente usados.

Segundo um relatório recente de Hoang; Nghiem (2021) a produção mundial de etanol em 2019 foram 110 bilhões de litros. No Brasil, em 2022, a produção total de etanol registrou alta de 2,5%, totalizando 30,7 milhões de m<sup>3</sup> (Gov. 2022) . A produção de etanol aumentou 8%. A taxa média anual de crescimento da produção de etanol para o período 2013-2022 foi de 1,1%. O tamanho do mercado global de álcool foi avaliado em US\$ 2,2 bilhões em 2021 e deverá crescer a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 4,3% de 2022 a 2030 Grandviewresearch (2020). O crescimento do mercado é impulsionado pelo aumento do consumo de etanol.

A conversão de açúcar em etanol é realizada principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que pode ser representada pela seguinte equação química.

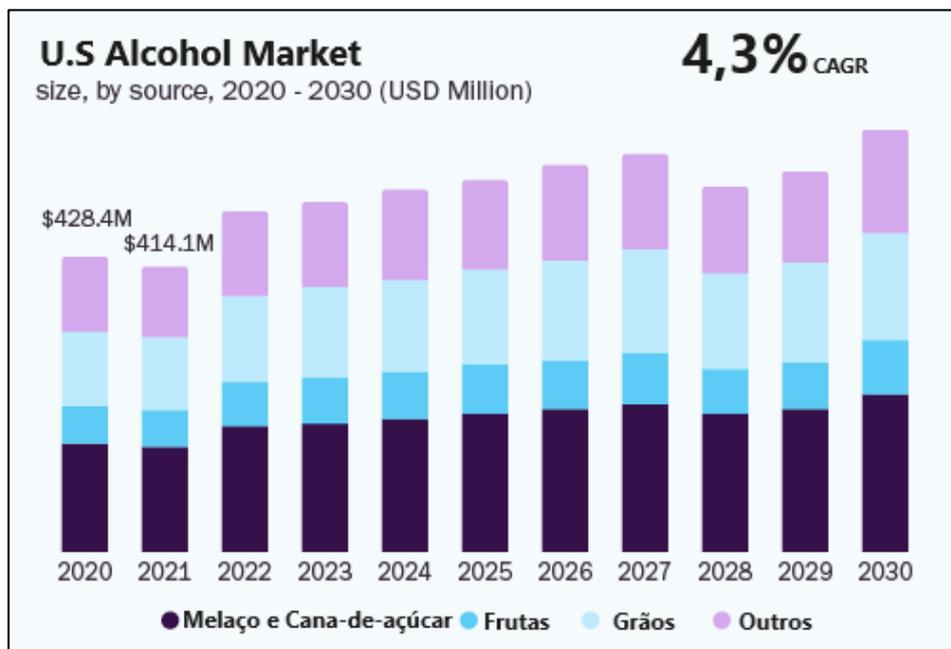


Os dois maiores produtores de bioetanol de (1G)são os Estados Unidos (56%) e o Brasil (28%), que utilizam culturas amiláceas (principalmente grãos de milho) ou culturas

Figura 8: Relatório de taxa de crescimento anual (CAGR) para etanol.

açucareiras (principalmente caldo de cana) como principal matéria-prima (Iram et al. 2022).

Fonte: Grandviewresearch (2020).



A produção e o mercado de bioetanol têm sido impulsionados pela necessidade de transição para fontes de energia mais sustentáveis e renováveis. Além de ser um biocombustível promissor, o bioetanol também possui uma variedade de aplicações em diversos setores. Desde sua utilização como combustível para veículos, na produção de produtos químicos, o bioetanol desempenha um papel crucial na economia moderna e na redução das emissões de carbono. À medida que avançamos em direção a uma sociedade mais sustentável, é essencial explorar e expandir ainda mais as aplicações do bioetanol, aproveitando ao máximo seu potencial como uma fonte versátil e renovável de energia e materiais.

#### 4.4.2 Aplicações para Etanol

Derivado principalmente de fontes renováveis, possui diversas aplicações e desempenha um papel crucial em várias áreas. Aqui estão algumas aplicações importantes do etanol:

**Combustível Sustentável:** O etanol é reconhecido como um combustível sustentável, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa. O consumo a partir de fontes renováveis, não emite enxofre e produz menos partículas e poluentes perigosos (PERIYASAMY *et al.* 2023).

**Indústria Automotiva:** A mistura de etanol na gasolina, conhecida como etanol combustível, adotada na indústria automotiva, contém nos termos da Lei nº9.478, de 6 de agosto de 1997, este teor deve ser estabelecido pelo Poder Executivo entre 18% e 27,5% BRASIL (2022). Proporciona não apenas uma redução nas emissões, mas também melhorando o desempenho dos motores.

**Indústria Química:** O etanol desempenha um papel fundamental na indústria química como uma matéria-prima versátil para a produção de produtos químicos, solventes, produtos químicos básicos como etileno, propileno, tolueno, xilenos, estireno e benzeno a partir do bioetanol (CSÉFALVAY *et al.* 2020). Sua natureza renovável contribui para a busca de alternativas mais sustentáveis na fabricação de produtos químicos.

**Geração de Energia Elétrica:** A utilização do etanol na geração de energia elétrica, por meio de tecnologias como células a combustível, representa uma inovação importante na matriz energética, contribuindo para a sustentabilidade ambiental. A tecnologia de células de combustível representa uma inovação promissora no campo da energia limpa, caracterizada por sua elevada eficiência energética (Antolini 2007). As Células a Combustível de Etanol Direto de Baixa Temperatura (DEFCs) destacam-se devido às vantagens oferecidas pelo etanol líquido, que possui alta densidade energética. Além disso, as DEFCs são atraentes pela sua origem sustentável, sendo produzidas a partir de biomassa, o que as torna ideais para aplicações em transporte e dispositivos portáteis (Sheng *et al.* 2020).

#### **4.4.3 Principais Formas de Obtenção**

Produzido a partir de fontes renováveis, como açúcares e amidos encontrados em plantas. Existem várias formas de obtenção de bioetanol, como:

**Fermentação de Açúcares monoméricos:**

Uma das principais fontes para a produção de bioetanol é a fermentação de açúcares provenientes de culturas como a cana-de-açúcar (IRAM *et al.* 2021). Uma das matérias-primas mais eficientes para a produção de bioetanol devido ao alto teor de sacarose, é a cana-de-açúcar (SANDHU *et al.* 2022).

#### Fermentação de Hidrolisados de Amido:

Outra abordagem comum é a utilização de amidos presentes em culturas como milho. De acordo com (Liu et al. (2023)), o milho é uma fonte importante para a produção de bioetanol, apresenta diversas vantagens, incluindo rápida regeneração, abundância e baixo custo. Consequentemente, tem atraído significativa atenção como uma boa fonte para a produção de bioetanol, conduzindo à otimização da matriz energética e à melhoria do ambiente ecológico.

#### Hidrólise Enzimática de biomassa lignocelulósica:

Hidrólise enzimática é empregada para quebrar materiais celulósicos em açúcares fermentáveis. Conforme destaca LI *et al.* (2023), durante o processo, os açúcares de segunda geração obtidos pela hidrólise da biomassa lignocelulósica também podem ser utilizados para produzir uma ampla gama de bioprodutos. Essa versatilidade dos microrganismos tem potencial para impulsionar avanços significativos em diversos setores, além de seu papel fundamental na fermentação para produção do bioetanol.

A hidrólise enzimática é uma opção mais seletiva para liberar glicose da celulose em condições brandas. O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as  $\beta$ -glucosidases (BOHÓRQUEZ, 2017).

Endoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glucano glicanohidrolases), são enzimas que atuam na hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas internas nas cadeias poliméricas de celulose, clivando-as, facilitando sua degradação. Esse processo resulta na produção de oligossacarídeos insolúveis e celodextrinas solúveis, com graus de polimerização de até seis unidades de glicose (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010).

Exoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glicano celobiohidrolases), catalisam a clivagem das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas nas extremidades, liberando pequenos oligossacarídeos, principalmente celobiose. Essas enzimas desempenham um papel crucial na hidrólise dos terminais redutores e terminais não redutores (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010).

$\beta$ -Glicosidase ( $\beta$ -D-glicohidrolase ou celobiase), é responsável pela hidrólise da celobiose, liberando monossacarídeos (principalmente D-glicose). Além de promover a liberação de glicose, essa enzima desempenha um papel importante no controle da inibição por celobiose das endoglucanases e exoglucanases (FARINAS, 2011).

#### **4.4.4 Microrganismos Produtores**

Os principais microrganismos produtores de etanol incluem diferentes cepas de leveduras, sendo a mais comum é *Saccharomyces cerevisiae*, também há outros tipos como *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Wickerhamomyces anomalus* X19 (Ben Atitallah et al. 2022). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é particularmente amplamente utilizada na produção de etanol, devido à sua capacidade de fermentar açúcares presentes em matérias-primas como cereais e vegetais.

Cabe destacar que a produção de etanol por microrganismos é um processo biotecnológico crucial, aplicado em larga escala na indústria de biocombustíveis. A fermentação alcoólica realizada por essas leveduras converte os açúcares presentes em matérias-primas vegetais em etanol e dióxido de carbono, gerando assim uma fonte sustentável de combustível.

#### **4.4.5 Bioetanol e Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**

O objetivo de desenvolvimento sustentável, (energia acessível e limpa) ODS 7, inclui um aumento na quota de energias renováveis; abrange eletricidade, cozinha, aquecimento (Huck 2023). Além do ODS 7, os biocombustíveis contribuem para atingir o ODS 13 (ação climática), diminuindo as emissões de carbono no setor de transporte (NAZARI *et al.* 2021). Ademais, no âmbito do ODS 8 (trabalho digno e crescimento econômico), a indústria abriria novas oportunidades de emprego que vão desde a construção e operação de unidades de produção e transporte de matéria-prima (Singh et al. 2017). Conforme a meta de (consumo e produção responsável) ODS 12, a biomassa disponível poderia aumentar o consumo interno (GIURCO 2020). Unidade de valor econômico (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ODS 9 retrata a contribuição da indústria do bioetanol para alcançar diferentes objetivos de desenvolvimento sustentável.

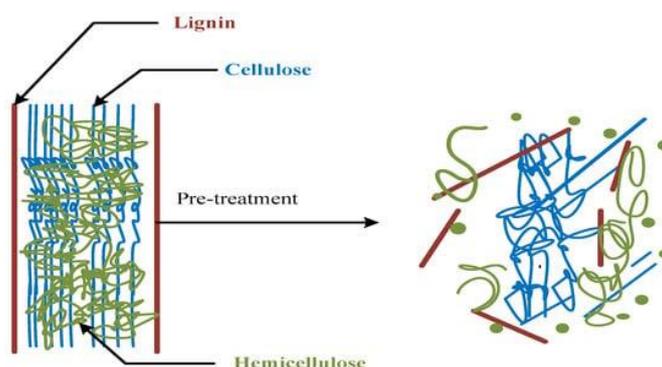
#### **4.4.6 Pré-Tratamento**

O pré-tratamento de biomassa é um método que facilita caminhos para converter biomassa em produtos valiosos. Melhora a seletividade do processo para determinados produtos, por aumentar a conversão de celulose, hemicelulose e lignina pela abertura das fibras poliméricas, tornando os polímeros de biomassa mais acessíveis (ZADEH *et al.*, 2020). Esquema ilustrativo na figura 9.

Para Den *et al.* (2018) o pré-tratamento considerado bem-sucedido, deve-se atender:

- Alta digestibilidade da matéria-prima liberados na fração líquida.
- Recuperação dos carboidratos para evitar a perda de rendimento de conversão.
- Redução de compostos inibidores durante o pré-tratamento.
- Reduzir o consumo de água, energia e produtos químicos tóxicos.

Figura 9: Representação esquemática da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.



**Fonte:** Zadeh et al. (2020).

#### 4.4.7 Métodos de Pré-Tratamento

Para Liu, (2020) existem pelo menos três etapas na conversão de biomassa: pré-tratamento; craqueamento ou transformação de biomassa em moléculas intermediárias; e conversão (das moléculas intermediárias para produtos desejados).

No pré-tratamento o processo pode ser físico, físico-químico, químico ou biológico Castro (2014).

Os métodos físicos, como cominuição/trituração mecânica, diminuem o tamanho e a densidade das partículas de biomassa, afetando o fluxo de calor e a transferência de massa em processos subsequentes (KUMAR *et al.*, 2020).

Já os físico-químicos são utilizados para operar em uma abordagem híbrida, afetando os parâmetros físicos, bem como sua ligação química (clivagem de ligação) e interações intermoleculares, são chamados de técnicas físico-químicas. Os aspectos como temperatura ou pressão são usados em conjunto com um processo químico. Essas técnicas costumam ser intensas e podem romper a estrutura do complexo lignocelulósico por meio de processos como a explosão com vapor, hidrotreatamento, irradiação de micro-ondas e oxidação úmida

(TAYLOR *et al.* 2019).

Explosão com vapor catalisada por CO<sub>2</sub> – neste caso, o material é impregnado com CO<sub>2</sub> que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico (Castro, 2014).

Explosão a vapor ou auto-hidrólise - o material é tratado com vapor de água saturado em alta pressão e temperatura. Após um tempo, o sistema é rapidamente despressurizado e repressurizado, o que significa que o vapor é forçado a entrar na rede porosa dos resíduos fibrosos e, após a descompressão, se expandirá rapidamente, causando uma 'explosão' (TAYLOR *et al.* 2019).

Água superaquecida/ou hidrotreatamento térmico (LHW) - Os processos hidrotérmicos também podem ser usados como uma ferramenta para o pré-tratamento de resíduos. Em geral, são muito semelhantes à explosão de vapor, mas, o processo é normalmente conduzido em temperaturas próximas a ebulição da água temperatura. No entanto, temperaturas na faixa de 160 a 250 °C podem ser utilizadas, mas com pressão muito menor ( $\cong 5$  bar). Este pré-tratamento causa a hidrólise parcial da hemicelulose e também reduz o teor de lignina (TAYLOR *et al.*, 2019).

Os métodos químicos, removem geralmente os minerais e metais alcalinos da biomassa, melhoram seu valor calorífico e aumentam outras propriedades da biomassa, passando também por etapas importantes cujo intuito é melhorar as características das matérias-primas a serem utilizadas durante o processo de obtenção do produto (KUMAR *et al.* 2020).

O pré-tratamento ácido é um processo que utiliza ácidos como catalisadores para a hidrólise das frações polissacarídicas, em temperaturas que variam de extremas a moderadas, com o objetivo de hidrolisar a celulose e a hemicelulose. Os ácidos auxiliam na solubilização dos componentes sólidos da matriz lignocelulósica de resíduos de biomassa. O processo pode ocorrer com diferentes graus de severidade, baixo para hidrólise da hemicelulose e mais alto para a hidrólise da celulose. O grau de sinergismo é definido como o efeito sinérgico entre a temperatura, concentração de ácido, tempo de exposição (TAYLOR *et al.* 2019).

Ozonólise: Devido à deficiência eletrônica do ozônio, ele atacará preferencialmente, (compostos aromáticos e fenólicos). Dessa forma, a destruição da lignina é mais seletiva do que outras áreas de degradação na matriz de resíduos lignocelulósicos. Além disso, a hemicelulose também pode sofrer alterações leves. Este pré-tratamento também é usado em conjunto com tratamentos ácidos para reduzir o teor de lignina que é geralmente insolúvel em

ácido (TAYLOR *et al.* 2019);

Pré-tratamento alcalino - a presença de álcalis durante o processo de hidrólise permite a extração de uma parte dessas frações (lignina e hemicelulose), ao mesmo tempo, em que é reduzida a cristalinidade das fibras do componente celulósico. O pré-tratamento alcalino leva a solubilização de lignina e hemicelulose. Isso é conseguido pela clivagem de ligações éster e saponificação alcalina de ésteres acetil liberando acetato na ausência de altas temperaturas operacionais (SAHOO *et al.* 2018).

Deslignificação oxidativa - neste processo ocorre a degradação da lignina em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Processo organosolv - uma mistura de ácido e solventes orgânicos (geralmente etanol) é utilizada neste processo para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose (CASTRO, 2014).

Nos pré-tratamentos biológicos são utilizados biocatalisadores (enzimas) ou microrganismos para clivar seletivamente as ligações presentes no material lignocelulósico.

#### **4.4.8 Pré-Tratamento com Ácido Diluído**

A hidrólise ácida em meio aquoso é frequentemente usada para tornar a celulose mais acessível, mas não como um procedimento de fracionamento, mas porque retém a maioria da lignina e da fração residual de celulose. Este é um método simples, barato e bem estudado segundo (CASTRO, 2014 e KAUR; KUHAD, 2019). Em condições de hidrólise, a lignina é parcialmente dissolvida no meio ácido, embora parte da lignina precipite após o resfriamento; esse fenômeno dificulta a ação posterior das enzimas hidrolíticas, sendo fonte de problemas ao longo do processo. O uso de catalisadores ácidos fortes, como o ácido sulfúrico, reduz a lignina insolúvel e simplifica o processamento (VERGARA *et al.*, 2018).

Em suma, a conversão de lignocelulose em açúcares e lignina requer um pré-tratamento para tornar os polissacarídeos prontamente disponíveis, especialmente com a adição de métodos enzimáticos. A hidrólise com ácido sulfúrico diluído é um dos métodos de pré-tratamento mais comumente usados para o fracionamento do complexo lignocelulósico, embora apresente algumas desvantagens, como formação de inibidores, presença de lignina insolúvel (VERGARA *et al.*, 2018).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Material

A biomassa residual de açaí foi adquirida do município de Anori, situado no interior do Amazonas, e posteriormente transportadas para o Núcleo de Produtos Naturais (NPN) do Centro de Bionegócios da Amazônia. No laboratório, as amostras foram submetidas a um processo de padronização e homogeneização utilizando moinhos de facas e/ou martelo com malha (0,45mm). Esse procedimento foi realizado para garantir que as fibras fossem analisadas de forma precisa, sem interferências decorrentes da variação do material padronizado.

### 5.2. Microrganismos e Meio de Ativação

A cepa *Actinobacillus succinogenes* (DSMZ 22257) foi adquirida do banco de células alemão, liofilizada e cedidas para o Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos – UFRJ, onde foi feita a ativação celular, a manutenção do microrganismo e criopreservação em freezer -80°C.

A ativação foi realizada em meio TSB (Tryptic Soy Broth – Caldo de Triptona de Soja), da marca Kasvi, contendo uma mistura de peptona de caseína 17,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L, peptona de soja 3,0 g/L, glicose 2,5 g/L e fosfato dipotássico 2,5 g/L. O microrganismo apresenta a forma de bacilos, mas por ser pleomórfico pode também se apresentar em uma forma mais oval conforme teste GRAM. As condições de ativação em meio líquido, foram feitas em meio TSB a uma concentração de 30 g/L e as células foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a ativação, essas células foram armazenadas em criotubos a -80°C utilizando glicerol 20%, criogênio protetor para evitar a formação de cristais de gelo que afetam a viabilidade celular.

Para o processo de produção de etanol 2G, a partir de hidrolisados ácidos utilizou-se uma cepa de levedura comercial *S. cerevisiae*, que foi utilizada para a fermentação alcoólica em meio quimicamente definido e hidrolisado de sementes de açaí. As fermentações ocorrem em frascos agitados/fermentômetros, nas condições foram 35°C e 150 rpm com o tempo variando de 3,5h a 6h.

### **5.3. Caracterização do Material Residual**

#### **5.3.1 Determinação do Teor de Extrativos**

Para determinar o teor de extrativos, os procedimentos foram conduzidos utilizando um aparelho Soxhlet, composto por balão extrator de 250 mL acoplado ao condensador de bolas, que foi aquecido a 80°C e resfriado por banho-maria à 3°C (Quimis). Foram adicionados 4,0g de material padronizado em cartucho e colocados no soxhlet, juntamente com 150mL de solvente (etanol), no período de 5h. Após essa etapa, o solvente foi recuperado em rotaevaporador (Buchi), para restar somente o extrativo, então o balão foi colocado em estufa a 105°C por 24h. Após esse tempo retirou-se o material e pôs em dessecador por 20 minutos e pesados para quantificação do teor de extrativos (MORAIS, ROSA e MARCONCINI, 2010).

#### **5.3.2 Avaliação do Teor de Lignina**

Para a determinar do teor de lignina, utilizou-se 1,0g do material, sem umidade e extrativos. Essa quantidade foi inserida em almofariz, ao qual foi adicionado 17,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (v/v), em seguida, o material foi macerado por 15 minutos com o auxílio de um pistilo e deixado em repouso por 24h. Após esse período de digestão, adicionou-se 153 mL de água destilada ao almofariz para transferir todo o conteúdo para o balão de 300mL conectado a um condensador espiral para manter o material em aquecimento e refluxo por 4 horas. Posteriormente, o conteúdo do balão despejado em funil de vidro sinterizado tipo 4, acoplado em kitassato e bomba de vácuo para filtração. Após a lavagem com água destilada, o precipitado retirado no funil foi levado a estufa a 105°C por 24h. Após esse tempo, retirou-se o material da estufa e colocou-se em dessecador por 20 minutos e pesados para quantificação do teor de lignina (MORAIS, ROSA e MARCONCINI, 2010).

#### **5.3.3 Avaliação do Teor de Celulose**

Antes de iniciar o procedimento de extração da holocelulose, foi preparado um banho com glicerina aquecidos em chapa para manter a temperatura a 70°C juntamente com agitação. Em frasco de Erlenmeyer de 500mL, foram adicionados os seguintes componentes: 3,0g do material previamente desprovidos de umidade e extrativos, 2,5g de clorito de Sódio (NaClO<sub>2</sub>), 1 mL de ácido acético e uma barra magnética para garantir a agitação durante a reação. Em seguida foram adicionados 120mL de água destilada, levados ao aquecimento por

1hora. Após esse período adicionou-se novamente o mesmo quantitativo de todos os reagentes por mais 1 hora. Finalmente, pela última vez, os mesmos quantitativos de todos os reagentes foram adicionados e a reação foi mantida por mais 3 horas. Posteriormente, o conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado em funil de vidro sinterizado tipo 2 e lavado com água destilada. Em seguida, o material foi levado a estufa por 18 h. Após esse período, deixados em dessecador por 20 minutos e pesados para determinação do teor de holocelulose (MORAIS, ROSA e MARCONCINI, 2010).

#### **5.3.4 Avaliação do Teor de $\alpha$ -celulose**

Pesou-se 1,0g da holocelulose disposta em almofariz, adicionou-se 15mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 17,5%, então macerado por 8 minutos. Ao final desse tempo foi adicionado água destilada e filtrado em filtro sinterizado tipo 2. O funil com material recolhido, então, colocado em estufa 105°C por 18horas. Decorrente este tempo levado ao dessecador por 20 minutos e pesado para determinação do teor de  $\alpha$ -celulose (MORAIS, ROSA e MARCONCINI, 2010).

#### **5.3.5 Avaliação do Teor de Cinzas**

Pesou-se 2,0g das amostras em cápsulas, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador por 20 minutos e pesada. A Incineração em mufla se deu em 600°C por 3 horas. Resfriadas em dessecador por 20 minutos e pesadas, a avaliação feita em duplicata, método (LUTZ 2008).

#### **5.3.6 Avaliação do Teor de Umidade**

Para avaliação do teor de umidade pesou-se de 3 g da amostra em placas de petri, previamente tarada, aqueceu-se durante 12 horas a 105°C em estufa de circulação de ar (Marconi), resfriadas dessecador e pesadas, (LUTZ 2008).

#### **5.3.7 Potencial Hidrogeniônico (pH)**

Pesou-se 5 g da amostra em um béquer e diluídos em 45 mL de água destilada. O conteúdo foi agitado até que as partículas se diluíssem, considerando que se tratava de subprodutos, em seguida filtrado. O pH foi determinado utilizando um aparelho (PHS-3E) previamente calibrado, utilizando soluções tampões pH 4, 7 e 10. Repetiu-se o procedimento em triplicata (LUTZ 2008).

### 5.3.8 Grau Brix e Índice de Refração

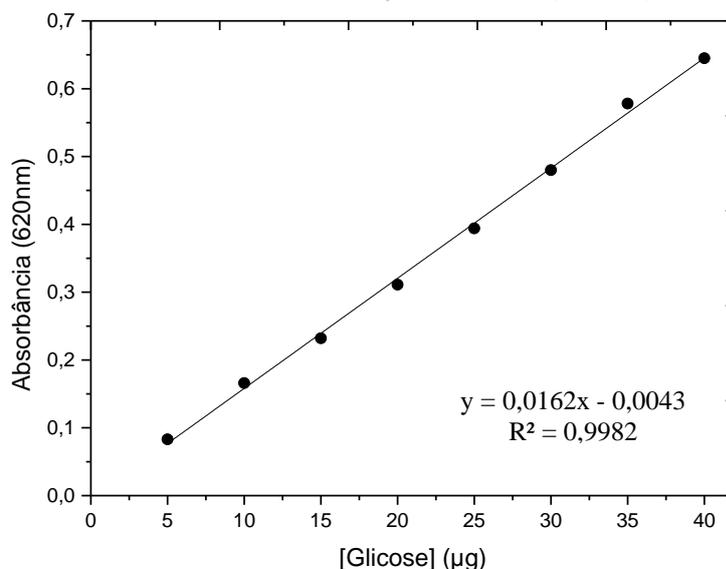
Antes de iniciar o procedimento, ajustou-se o refratômetro para a leitura de  $n$  em 1,333 com água a 20°C, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida foram transferidas de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro. Após aguardar a equilibração da amostra no prisma do equipamento, realizou-se a leitura diretamente na escala para determinar graus Brix.

Para determinação do índice de refração, seguiu-se a mesma metodologia, ajustando a escala para (nD20). Inicialmente, foi realizada a calibração padrão com água e, em seguida feita a leitura da amostra. A metodologia foi baseada em (LUTZ 2008).

### 5.3.9 Determinação de Açúcares Solúveis Totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método Antrona (LENG *et al.* 2016). A extração segue uma base utilizando etanol 95%. As leituras foram feitas usando um espectrofotômetro digital UV-visível (Modelo GTA-97) em um comprimento de onda de 620 nm usando uma curva padrão de glicose (100 µg/mL) variando de 5 a 40 µg. Os resultados são expressos como porcentagem (g/100 g).

Figura 10: Curva Padrão de Açúcares Solúveis Totais (Método da Antrona).



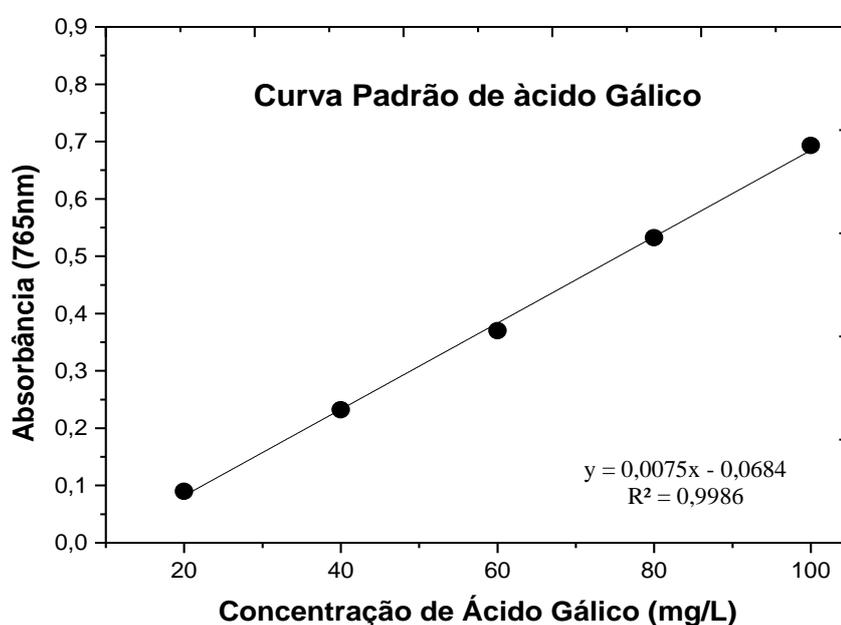
### 5.3.10 Extração de Compostos Fenólicos

Os extratos de compostos fenólicos foram obtidos utilizando o método de (AN *et al.* 2022). Foram utilizados 0,1 g do material triturado, misturadas com 10 mL de metanol 80% (v/v) e levadas ao banho ultrassônico por 30 min a 4°C. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi coletado.

### 5.3.11 Determinação de Compostos Fenólicos (CF) do Resíduo de Açai

A determinação dos compostos fenólicos do resíduo de açai foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por (ZITHA *et al.* 2022). Primeiramente foi preparada uma curva padrão utilizando ácido gálico. Uma alíquota de 0,25 mL do extrato foi misturada com 2,75 mL do reagente Folin-Ciocalteu (3%, v/v), agitada em misturador rotativo e deixada em repouso por 5 min. Em seguida, foram adicionados 0,25 mL de carbonato de sódio (10%, p/v), agitados e incubados no escuro por 60 min. A absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro UV/visível. Os resultados foram expressos em miliequivalentes de ácido gálico por 100 g de peso seco da amostra (mg GAE/100 g FM).

Figura 11: Curva Padrão de Ácido Gálico.



### **5.3.12 Avaliação de X-Ray Fluorescence (XRF)**

Para avaliar a composição inorgânica, todas as amostras foram caracterizadas por fluorescência de raios-X por energia dispersiva, do modelo Shimadzu EDX-720, usando tubo de raios X de Ródio (Rh) com tensão de 15 kV (Na a Sc) e 50 kV (Ti a U) com corrente máxima de 1000  $\mu$ A, colimador de 10 mm, tempo de integração de 100s, tempo morto do detector de 39%, refrigerado com nitrogênio líquido.

### **5.3.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos três materiais lignocelulósicos após o pré-tratamento ácido, foi realizado no CMABio (Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos) da Universidade do Estado do Amazonas-UEA. A técnica foi utilizada, para avaliar a morfologia da matéria-prima em diferentes etapas de degradação celulósica. A metalização foi feita com ouro por 4 minutos utilizando metalizador JOEL Smart Coater (camada de ouro cerca de 20 nm). Os ensaios em microscopia eletrônica de varredura foram realizados mediante o uso do equipamento Joel JSM-IT500HR (SOUZA et al., 2007).

## **5.4 Avaliação da Utilização de Manose como Fonte de Carbono para o Crescimento de *A. succinogenes***

### **5.4.1. Pré-Inóculo**

O pré-inóculo foi preparado com o meio TSB 30g/L suplementado com manose, nas concentrações 15, 30, 40 e 50g/L para adaptar as células a este tipo de substrato. Preparou-se 79 mL de meio TSB e a manose em cada frasco, de acordo com a concentração estipulada em g/L 1 ml da cultura estoque, para manter o volume do frasco em 80 ml. Conforme procedimento do Ladebio e (CHEN *et al.* 2021).

### **5.4.2 Fermentação**

Para fermentação em frasco Erlenmeyer de 500 mL foi utilizado o volume de 200 mL de meio estéril com a composição quimicamente definida contendo: extrato de levedura 5g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L, NaCl 1g/L;  $\text{MgCl}_2$  0,3g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,3g/L;  $\text{NaHCO}_3$  0,1g/L, e o pré-inóculo

com volume de 20mL (10% v/v), variando a concentração de manose.

## 5.5 Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado de Açaí como Substrato em Diferentes Estratégias de Condução.

### 5.5.1. Planejamento Fatorial para Otimização do Pré-Tratamento Ácido

Após ter sido feito a preparação e padronização de tamanho da matéria-prima, a condição para esta etapa foi similar a executada por Castro et al. (2021), conforme detalhado abaixo: concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para o planejamento fatorial foram nas condições (nível inferior 0,5% (v/v) e nível superior 1,0% (v/v)). Com relação a concentração de sólido (g) / líquido (mL) foram nas condições (nível inferior 1/40 e nível inferior 1/20). O tempo de exposição de pré-tratamento ácido em autoclave a 121°C foram (nível superior 30 min e nível inferior 60min). Remoção de hemicelulose (fase aquosa) através de filtração à vácuo, filtros de 0,22 µm e a fase sólida contendo a chamada celulignina, após realizadas a caracterização completa de carboidratos.

Na Tabela 3 são mostrados os parâmetros utilizados nesta etapa da pesquisa. Estipulado os níveis mínimos e máximos a ser executado na hidrólise ácida do resíduo do açaí para extração da manose como fonte de carbono. Em seguida foi executado o Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup> que gerou um total de 8 experimentos, correspondentes a distribuição fatorial e 3 relativos às réplicas do ponto central, totalizando 11 ensaios).

Tabela 2: Variáveis analisadas no planejamento fatorial fracionário e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0,5	1,0
Concentração de sólido (g) / líquido (mL)	1/40	1/20
O tempo do pré-tratamento ácido (min)	30	60

Tabela 3: Esquema do programa Estatística do planejamento fatorial.

Matriz de Experimentos e Resposta (Manose)			
Item	S:L	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	Tempo
1	0,025	0,5	30
2	0,050	0,5	30
3	0,025	1,0	30
4	0,050	1,0	30
5	0,025	0,5	60
6	0,050	0,5	60
7	0,025	1,0	60
8	0,050	1,0	60
9 (C)	0,0375	0,75	45
10 (C)	0,0375	0,75	45
11 (C)	0,0375	0,75	45

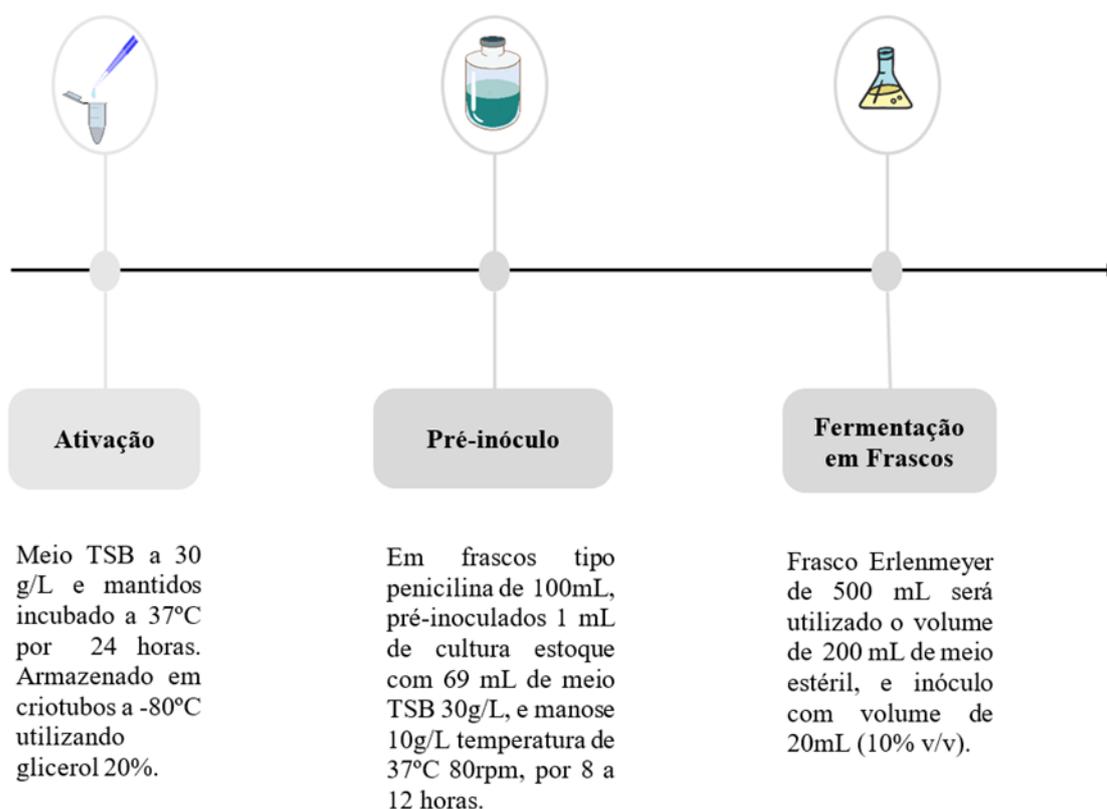
#### 5.5.2 O Meio de Fermentação para *Actinobacillus succinogenes*

O meio de fermentação foi composto de três partes: (1) uma mistura de nutrientes e sais, (2) hidrolisado ácido (3) tampão de fosfato. A mistura de nutrientes e sais consistiu em (em g L<sup>-1</sup>): 6,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g L<sup>-1</sup> NaCl; 0,2 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0,2 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O g L<sup>-1</sup>. A solução de hidrólise, foi conforme planejamento experimental.

#### 5.5.4 Fermentação

Nesta etapa todos os experimentos foram realizados com o hidrolisado, tendo a manose como substrato para a produção de ácidos orgânicos, mantendo-se os valores de concentração dos demais componentes presentes na solução. Os experimentos foram executados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio contendo (6,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g L<sup>-1</sup> NaCl; 0,2 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0,2 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O g L<sup>-1</sup>, (previamente estéril), adicionado o pré-inóculo (20 mL) preparado com o meio TSB 30g/L. As condições de cultura na incubadora foram temperatura a 37°C e agitação a 80 rpm.

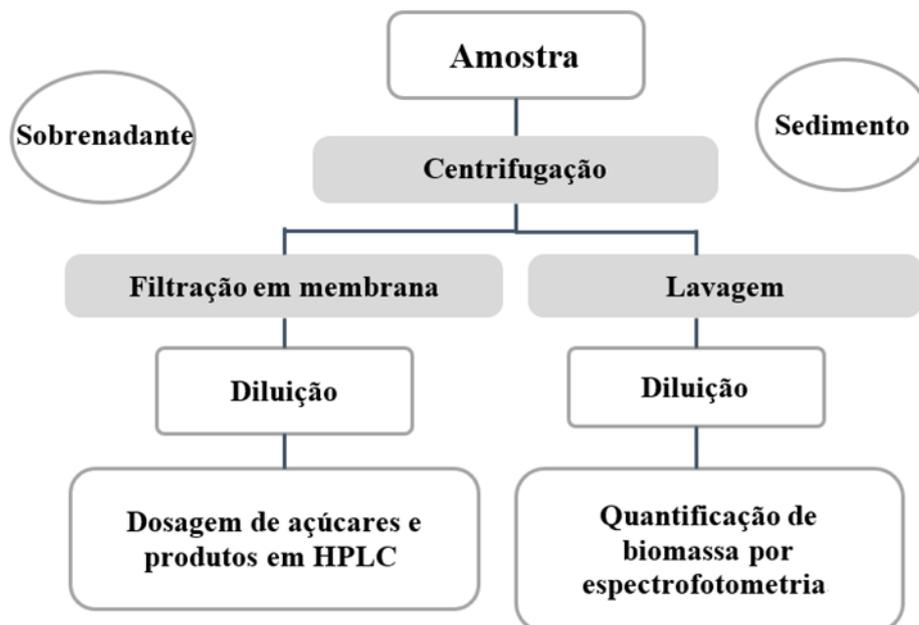
Figura 12: Fluxograma de esquema das etapas para o processo de fermentação.



## 5.6 Amostragem para Análise

Durante os experimentos, foram retiradas alíquotas de 2 mL a cada três horas, utilizando pipetas estéreis. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana com uma porosidade de 0,22  $\mu$ m para as dosagens de açúcares e produtos. Para análise de oxigênio dissolvido (OD), as amostras foram lavadas e completadas com água destilada, sendo em seguida homogeneizadas, para promover a ressuspensão das células antes da quantificação.

Figura 13: Diagrama para o processamento das amostras.



### 5.6.1 Determinação de Açúcares Presentes na Amostra

A quantificação de açúcares (manose, glicose, xilose, arabinose, sacarose, celobiose) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters, com detector de índice de refração (RID), acoplado a uma coluna Hi-Plex. As condições operacionais para a fase móvel foram: água MilliQ acidificada ( $H_2SO_4$ ), com vazão 0,6 mL/min, a pressão 200 psi, o volume da amostra 5  $\mu$ L, a temperatura externa do forno 85°C, a temperatura interna do detector 40°C.

### 5.6.2. Determinação da Concentração de Ácidos

As concentrações de ácido succínico, ácido acético e fórmico e foram determinadas por CLAE em cromatógrafo 'Waters' (Sistema de bombeamento modelo 510, Coluna Hi-Plex, as condições operacionais utilizadas serão na fase móvel, água acidificada ( $H_2SO_4$ ), vazão da fase móvel 0,9 mL/min, pressão máxima 2000 psi, volume de amostra 20  $\mu$ L, temperatura externa do forno 50°C, temperatura interna do detector 35°C.

### 5.6.3. Determinação da Concentração de Etanol

As concentrações de etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo SHIMADZU, utilizando uma fase móvel, água acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e coluna HPX 87 H. As condições operacionais incluíram o uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fase móvel, uma vazão de fase móvel de 0,6 mL/min, tempo de corrida 20 min, temperatura forno de 60°C.

### 5.6.4 Observação Microscópica

Após o crescimento das bactérias no meio, uma amostra foi retirada e preparado esfregaço em lâminas de vidro, a coloração foi realizada conforme o método de Gram, e analisada em microscópio binocular com ampliação de 1000X.

A Figura 20 mostra uma fotomicrografia de uma colônia de células, usando a técnica colorimétrica de Gram. Pode-se visualizar que a morfologia, da célula apresentou cor rosa, confirmando os ingredientes e estruturas do tipo Gram (-), de acordo com a parede celular de *Actinobacillus*.

### 5.6.5 Determinação da Curva Padrão para *Actinobacillus succinogenes*

Para elaboração desta curva, foram cultivadas em frascos de penicilina de 100mL, contendo 70mL de meio de ativação, dispostos em shaker a 170rpm a 37°C. Após 12 h de incubação, resuspensas em água destilada e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

Na determinação da massa seca, retirou-se 2 mL do seu sobrenadante e colocadas em filtros previamente pesados e colocados em estufa a 60°C. A massa seca determinou-se pelo peso do filtro após secagem.

A partir da suspensão das células foi feita curva padrão e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco.

A curva relaciona a concentração celular medida a 600nm, observando os valores do coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>), para determinar o valor da concentração celular em g/L para cada experimento realizado. A concentração de biomassa em cada ponto foi dada pela seguinte expressão:

$$X = \left( \frac{Y}{a} - b \right) * d$$

Onde (Y) é a absorbância medida pelo espectrofotômetro a 600 nm e (d) é a diluição

feita para ler a amostra, (a) coeficiente angular e (b) coeficiente linear.

### 5.6.6 Variáveis Respostas

O fator de rendimento em ácido ( $Y_{P/S}$ ), a produtividade volumétrica ( $Q_P$ ), o rendimento em células ( $Y_{X/S}$ ) e a concentração de ácidos foram os parâmetros utilizados para avaliar o processo fermentativo.

a) Fator de rendimento de produção de ácido (g/g):

$$Y_{P/S} = - (\Delta P / \Delta S) = (P - P_0) / (S_0 - S)$$

Onde:

P: concentração final de ácido (g/L)

P<sub>0</sub>: concentração inicial de ácido (g/L)

S: concentração final de substrato (g/L)

S<sub>0</sub>: concentração inicial de substrato (g/L)

b) Produtividade Volumétrica (g/L.h):

$$Q_P = (P - P_0) / t_f$$

Onde:

P: concentração final de ácido (g/L)

P<sub>0</sub>: concentração inicial de ácido (g/L)

t<sub>f</sub>: tempo de fermentação (h)

c) Fator de rendimento de crescimento celular (g/g):

$$Y_{X/S} = - (\Delta X / \Delta S) = (X - X_0) / (S_0 - S)$$

Onde:

X: concentração final de células (g/L)

X<sub>0</sub>: concentração inicial de células (g/L)

S: concentração final de substrato (g/L)

S<sub>0</sub>: concentração inicial de substrato (g/L)

### **5.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) do microrganismo, foi realizado no CMABio (Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos) da Universidade do Estado do Amazonas-UEA. A técnica foi para avaliar a morfologia das duas cepas: *Actinobacillus succinogenes* (DSMZ 22257). Os ensaios em microscopia eletrônica de varredura foram realizados mediante o uso de um microscopia eletrônica de varredura Joel (JSM-IT500HR) e metodologia SOUZA (2007). Para fixação preparou-se solução de fixação Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, para formaldeído 2,5%, em tampão Cacodilato de Sódio 0,2 M pH 7.2); cortou-se pequenos pedaços da amostra (cerca de 1 cm) e transferir para uma placa de 24 poços contendo a solução de fixação Karnovsky. Deixou-se a amostra submersa na solução, em repouso por 24h em temperatura ambiente. Pós-fixação, após 24h, lavou-se 5 vezes cada amostra com solução tampão Cacodilato de Sódio 0,2 M pH 7.2; e pós fixou-se em solução de Tetróxido de Ósmio 2% e Ferrocianeto de Potássio 16% (os dois na proporção 1:1); e lavados com água destilada. A desidratação feito em série gradual de álcool (30%, 50%, 70%, 90% e 3x 100%) por 10 minutos em cada concentração. A Secagem, realizar a secagem em aparelho de Ponto Crítico automático Leica EM CPD300; Posicionado em blocos nos stubs (porta-amostras), sobre uma fita dupla face de carbono. Metalização se deu com ouro por 4 minutos utilizando o metalizador JEOL Smart Coater (camada de ouro de cerca de 20 nm), seguindo a visualização.

### **5.7 Avaliação da Utilização de Hidrolisado de Açaí como Substrato em Diferentes Estratégias de Condução para Produção de Etanol.**

Esta etapa parte dos experimentos foram realizados com o hidrolisado, tendo a manose extraída como principal fonte de carbono, e parte do experimento com manose sintética, alterando suas concentrações iniciais. Foi executado em fermentômetros de 500 mL contendo 200 mL de meio, adicionado a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As condições de cultura na incubadora foram 35°C e 150 rpm.

Figura 14: Fluxograma de esquema das etapas para o processo de fermentação.



## 5.8 Análise Estatística

O planejamento experimental é uma ferramenta que busca facilitar o estudo de um sistema, sendo representado por um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios estatísticos e científicos para avaliar a influência de suas variáveis. Para realização dos testes foi aplicado um planejamento fatorial, este facilitou a compreensão, comparações e busca tendências, diferenças e similaridades (BOX e HUNTER, 1987; Rodrigues; Iemma (2014).

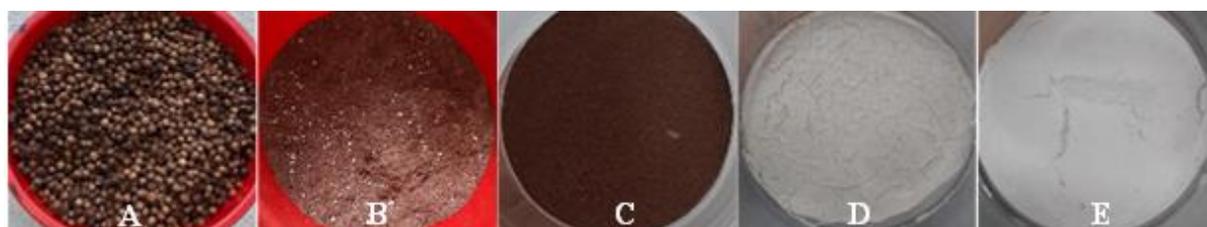
Foi apresentado também uma análise estatística dos dados com médias e desvio padrão coletados neste estudo, fornecendo uma visão abrangente, resultados, a fim de responder às questões de pesquisa. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), sendo considerado significativo para todos os casos, seguindo as indicações de Banzatto; Kronka (2006). Os cálculos estatísticos foram efetuados pelo programa Statistica 8.0.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Resíduo do Açaí Utilizado

A ausência de registros básicos sobre a morfologia e a caracterização dos resíduos de açaí dificulta a resolução de problemas associados ao aproveitamento das sementes após a extração da polpa, (FERREIRA MONTEIRO *et al.* 2019). Embora seja tecnicamente possível utilizar as sementes para a produção de etanol, Ferreira-Pereira *et al.* (2021) comentam que para tal, estudos de caracterização, são cruciais para compreensão do processo. Para o desenvolvimento do presente trabalho, estão apresentados visualmente os diferentes aspectos das sementes de *Euterpe oleracea* após o seu processamento (Figura 15). A figura representada pela letra (A), ilustra o resíduo das sementes após o processo de despolve; a letra (B) é a imagem das sementes moídas em moinho de martelo. A imagem codificada pela letra (C) mostra a lignina extraída das sementes por meio da digestão com ácido sulfúrico a 72% (v/v) por 24h, após etapas de condensação e refluxo por 4h em condensador. A figura codificada pela letra (D) representa a holocelulose extraída da semente pela adição de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) e ácido acético. Por fim, a figura codificada pela letra (E) mostra a alfacelulose extraída a partir da holocelulose, adicionando-se hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a 17,5% (m/v).

Figura 15: Resultados visuais das caracterizações lignocelulósicas das sementes de açaí: (A) Resíduo proveniente de despolvamento, (B) Biomassa moída em moinho de martelo, (C) Lignina, (D) Holocelulose e (E) Alfacelulose.



### 6.2 Caracterização Físico-Química do Resíduo.

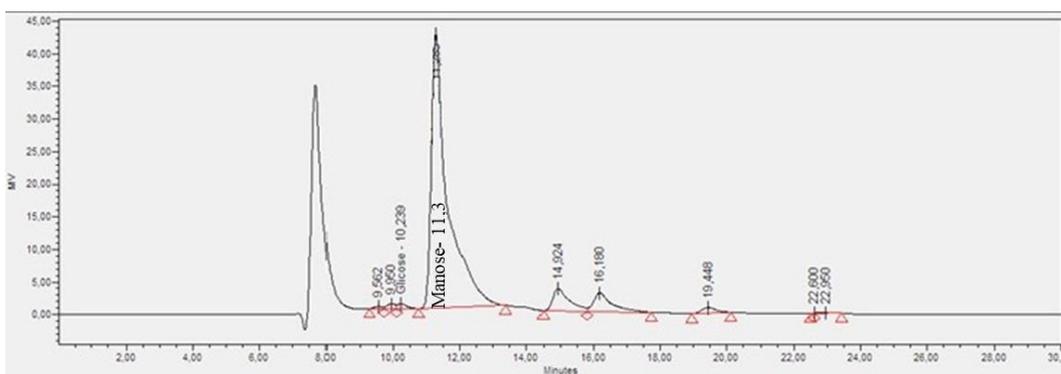
O açaí é conhecido por suas propriedades nutricionais e características físico-químicas, aqui alguns resultados encontrados neste trabalho, em relação a semente (chamada resíduo).

Tabela 4: Resultados da caracterização físico-química das sementes de açaí.

Variáveis/ Componentes	Valor/porcentagem ± desvio padrão
pH	5,47± 0,005
°Brix	3,15± 0,005
Índice de Refração	1,33± 0,001
Umidade	7,30 ± 0,06
Cinzas	1,53 ± 0,05
Açúcares Totais	2,01 ± 0,42
Extrativos	11,48 ±0,002
Lignina	29,00 ±1,41
Holocelulose	60,42±0,87
Alfcelulose	30,81±2,31
Hemicelulose	29,61±2,97

O cromatograma apresentado na figura 16 representa o perfil de açúcares do hidrolisado citado acima na tabela 4. Observa-se que manose é o açúcar predominante no resíduo de açaí, com um tempo de retenção em 11,3 característico da manose. A análise cromatográfica fornece informações valiosas sobre a distribuição e a quantidade relativa de açúcares presentes na amostra, o que é essencial para a caracterização completa de biomassa lignocelulósica e para o desenvolvimento de processos de produção de substâncias de interesse comercial.

Figura 16: Cromatograma de perfil de açúcares



Observando-se a Tabela 1, verifica-se que o pH, após suspensão em água apresentou valores de aproximadamente 5,5, o valor está dentro da faixa esperada para o extrato aquoso da semente de açaí, sugerindo uma moderada acidez, o que também foi corroborado por Zavarize (2021) que registrou pH de  $5,78 \pm 0,04$  para o extrato das sementes de açaí.

Com relação aos demais constituintes, o °Brix refere-se à concentração de sólidos solúveis, dissolvidos na água, como açúcares, sais, proteínas, entre outros, e, dessa forma, a leitura do valor medido abrange todos esses componentes na solução (CAVALCANTI *et al.* 2006). O valor de 3,15 indica uma baixa concentração de sólidos solúveis, o que está em conformidade com as características do extrato das sementes de açaí.

O teor médio de umidade da amostra foi de 7,30%, o que indiretamente representa o percentual de desidratação da amostra, enquanto os valores reportados por outros trabalhos variaram de 10 a 12% (De Lima *et al.* 2021), porém o resultado divulgado por Barros *et al.* (2021) foi de 7,17%, valor bem aproximado ao do presente trabalho.

Levando em consideração o teor de cinzas, a amostra revelou a presença de minerais (1,53%), resultado aproximado ao reportado por Barros *et al.* (2021) que foi de (1,01%) e por Rocha *et al.* (2022) que foi de (1,1%). No caso do açaí, essa quantidade pode ser influenciada pelos minerais naturalmente presentes no fruto. O baixo teor de cinzas e o elevado teor de polissacarídeos indica que essa biomassa (sementes e fibras) tem potencial para ser utilizada como matéria-prima para a conversão em biocombustíveis, como bioetanol e outras substâncias de interesse comercial (Shukor *et al.* 2016). Ao contrário, o alto teor de cinzas poderia inibir as enzimas  $\beta$ -mananase e celulase, responsáveis pela conversão de carboidratos complexos (como manana e celulose) em açúcares simples (DE LIMA *et al.* 2021).

Ao observar a quantidade de açúcares totais presentes no resíduo, os resultados mostram valores médios de 2,01 g/100g de açúcares totais disponíveis, esse resultado é comparável a outro reportado na literatura, como: 2,71 g/100 g (Oliveira *et al.*, 2020). Na ausência de dados para serem comparados aos teores de açúcares totais nas sementes de açaí, verificou-se a quantificação na polpa através do trabalho de Neves *et al.* (2015) destacaram o teor de açúcar total na polpa de açaí variando de 1,86 a 1,92 g/100 g, e Buratto *et al.* (2021) relataram que as concentrações encontradas foram de 1,41 (%) peso.

Antes de se desenvolver qualquer bioprocessamento tem-se que conhecer primeiramente a composição da matéria prima a ser utilizada. A composição lignocelulósica do resíduo de açaí apresentou os seguintes valores em termo de composição polissacarídica: 60,42% de

holocelulose, 30,81% de alfacelulose, 29,61% hemicelulose e em relação ao teor de lignina o valor ficou próximo de a 30%. Os valores percentuais para a semente de açaí descritos por Barros *et al.* (2021) foram menores que os descritos no presente trabalho, tendo sido relatado para celulose 45,49%, hemicelulose 21,08% e lignina com 24,36%. O alto teor de celulose contido nas sementes indica que o material tem grande potencial para a conversão em açúcares sendo, portanto, de interesse para a produção de ácidos orgânicos e etanol.

### 6.3 Compostos Fenólicos

Na tabela 6, estão apresentados os valores relativos à presença de compostos fenólicos, expressos em equivalente ao ácido gálico (AG), devido à capacidade do resíduo em reduzir do reagente Folin-Ciocalteau, em compostos fenólicos.

Tabela 5: Determinação de compostos fenólicos.

Amostra	Compostos Fenólicos (AG mg. g <sup>-1</sup> )
Resíduo açaí com extrativo	14,45±0,04 <sup>a</sup>
Resíduo de açaí sem extrativo	5,90±0,26 <sup>b</sup>

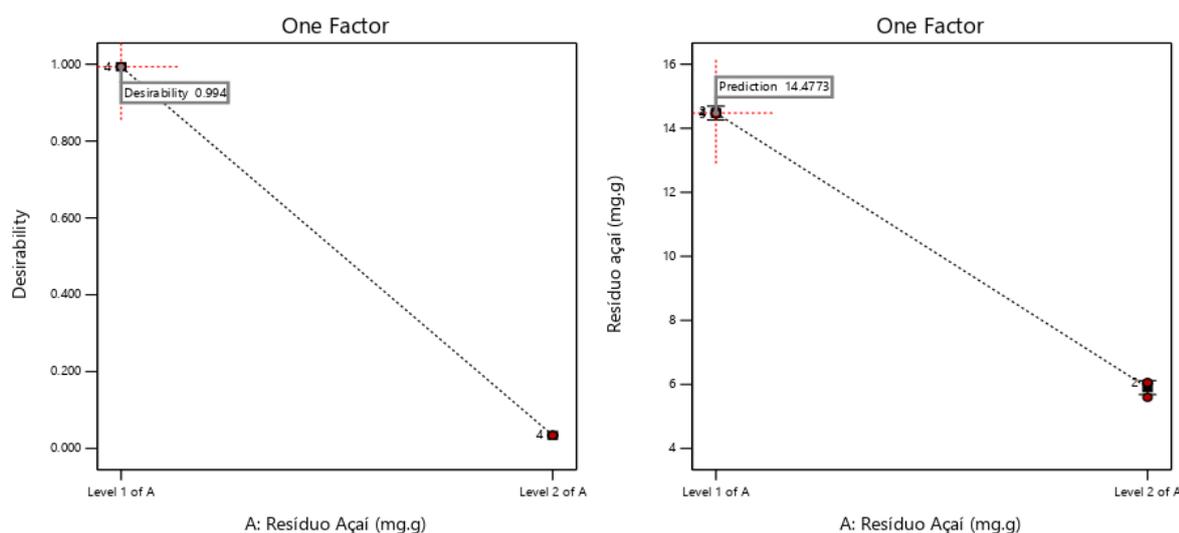
Nota: \*Valores apresentados sendo a média e o  $\pm$  desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente de acordo com o *design* One-Factor Categórico ( $p \leq 0,01$ ).

Ao avaliar os resultados relacionados a compostos fenólicos nas amostras de semente de açaí, uma possuía extrativos e a outra não possuía. O resíduo com extrativo, apresentou uma média de 14,4473±0,04 mg. g<sup>-1</sup>, enquanto no resíduo sem extrativo, a média foi de 5,9013±0,2651 mg. g<sup>-1</sup>. Isso sugere que o resíduo de açaí com extrativo possui uma concentração significativamente maior de compostos fenólicos em comparação com o resíduo de açaí sem extrativos. Essa diferença fica evidente que está relacionado à presença dos extrativos que podem conter uma variedade de compostos fenólicos adicionais. Foi conduzida uma análise estatística dos resultados, com intuito de fornecer uma confirmação adicional da diferença observada nas concentrações entre as duas amostras.

A análise desses resultados pôde ser discutida em termos de *design* experimental, através do *design* One-Factor Categórico (um fator com diferentes níveis) ou um *design* geral categórico de um fator. Nesse caso, o fator categórico foi a presença ou ausência de extrativos no resíduo de açaí. A notação "a" e "b" sugere que há diferença significativa entre as médias desses dois grupos.

Valores de  $p$  inferiores a 0,01 indicam que os termos foram significativos, e que há diferença na média dos tratamentos. Porém é preciso avaliar as condições de ensaio, por exemplo, o teste *me* indica que é desejável (*desirability*) utilizar o tratamento maior quantidade de compostos fenólicos (Level 1), contudo, quanto mais compostos fenólicos a amostra possui, maior a chance de inibição do crescimento do microbiano.

Figura 17: *One-Factor Categorical*, design geral multinível e categórico de um fator utilizando o software Stat-Ease 360



#### 6.4 Fluorescência de raios X da amostra in natura (FRX)

Os resultados de Fluorescência de Raios-X (FRX) fornecem informações valiosas sobre a composição elementar do resíduo de açai. A fim de se identificar os elementos presentes nas biomassas, foram realizadas análises de fluorescência de raios X, tendo em vista o valor de cinzas (1,53%) encontrado na etapa de caracterização das sementes. Os valores desses elementos encontram-se na Tabela 7. Observa-se que os componentes inorgânicos presentes nas sementes de açai podem ser divididos em macronutrientes e micronutrientes.

Tabela 6: Análise do perfil de minerais nas sementes de açai por FRX.

Elements	K	Ca	Ru	Fe	Mn	S	Si	Ag	Pd	Cu	Rb
Açai %	39,67	23,13	12,31	7,16	5,87	4,85	4,27	0,95	0,74	0,73	0,28

O potássio é necessário no metabolismo de carboidratos. Assim como o fósforo, os sais de potássio mais comuns são o monobásico e o dibásico. A constituição de potássio no resíduo de açaí foi de 39,67%, que atua como cofator para algumas enzimas. Baroň; Fiala (2012) afirmam que a participação de minerais é bastante complexa e a falta pode até resultar em déficits nutricionais e dificuldades associadas à fermentação. E para isto também são necessários os micronutrientes.

Com 23,13%, o cálcio é outro macronutriente importante, desempenhando várias funções em processos biológicos, como na estabilidade das membranas celulares. A presença adequada de cálcio ajuda a manter a integridade das membranas, permitindo que as células retenham seus conteúdos internos e protegendo contra danos (JAHED *et al.* 2023). Atua como um cofator para muitas enzimas, ativando-as e facilitando reações metabólicas essenciais para o crescimento celular e a produção de energia.

O enxofre, fornecido sob a forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  é a fonte mais comum e é essencial na produção de proteínas e aminoácidos (Suzuki *et al.* 2019), tendo sido encontrado o teor de 4,85% desse elemento. Sua importância se dá em especial na síntese de metionina e cisteína.

Vale ressaltar que resultados semelhantes são descritos por Barros *et al.* (2021) em que se destacam teores de K (30,64%), Si (23,67%) e Ca (16,04%). Guerreiro *et al.* (2022) relataram resultados para o K (45,24%), Ca (17,60%) e Fe (11,60%), confirmando os altos percentuais de potássio, cálcio e ferro, que é característica de matérias-primas provenientes de biomassa vegetal orgânica. As diferenças na composição de vegetais cultivados em diferentes regiões podem ser significativas e são influenciadas por diversos fatores ambientais e geográficos, como tipo de solo, clima, altitude (temperatura), variedade do vegetal, práticas agrícolas e época de cultivo.

A composição centesimal dos outros elementos presentes em quantidades muito baixas na célula viva, é importante para as funções biológicas e para maioria dos fabricantes de enzimas (Baudin 2021) está apresentada na mesma tabela. Os mais necessários para o metabolismo microbiano são Fe, Zn, Mn e Mg. A falta desses micronutrientes pode afetar a taxa de crescimento e, por consequência, o rendimento no processo (Khalaf *et al.* 2023). Neste trabalho, o ferro (Fe) apresentou o percentual de 7,16%. Este elemento atua como um regulador, sendo essencial para o metabolismo microbiano, desempenhando papéis importantes em processos como respiração, síntese de DNA, metabolismo de aminoácidos e proteção contra estresse oxidativo. Sua disponibilidade pode influenciar significativamente a fisiologia e o comportamento de microrganismos em diferentes ambientes (GROTTO

2010). O manganês (Mn) esteve presente com 5,87% na composição do resíduo, também é um cofator enzimático importante.

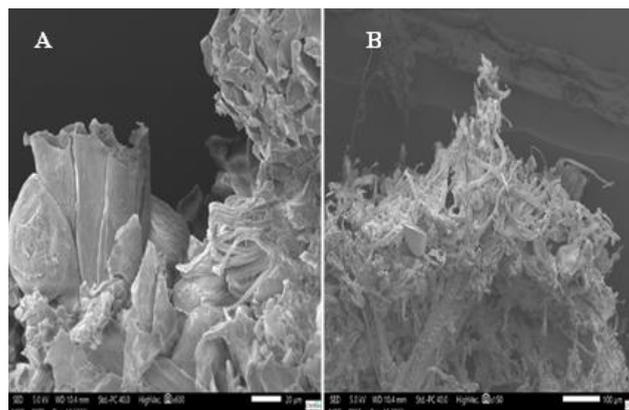
Segundo Baudin (2021), oligoelementos como o cobre estão presentes nas enzimas da cadeia respiratória, a presença de cobre no resíduo foi de (0,73%). A presença de rutênio no resíduo de açaí, foi de 12,31%, um dado interessante, pois o rutênio não é comumente encontrado em fontes vegetais (VONG *et al.* 2019). Vale a pena notar que, o rutênio é um metal de transição que têm diversas aplicações, algumas delas incluem: catalisadores em síntese orgânica, terapia fotodinâmica para o câncer e sensores eletroquímicos para detecção de amostras biológicas ANDRADE (2023). Pereira et al. (2008) comentam que os nutrientes inorgânicos podem atuar ainda de quatro maneiras na célula: transporte de nutrientes, levando à síntese de metabólitos necessários para a função celular; estimular o metabolismo como cofatores em reações enzimáticas; contribuir para as propriedades osmóticas, podendo também inibir o metabolismo celular.

## 6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de avaliar as alterações na superfície e morfologia da celulose e  $\alpha$ -celulose nas sementes de açaí após o pré-tratamento químico, esta técnica foi utilizada apenas para analisar a morfologia das sementes de açaí nas diferentes etapas do processo. E como esperado, após tratamento, as fibras de celulose se mostram mais amorfas e, portanto, mais suscetíveis ao ataque enzimático, caso, essa fração seja objeto de aproveitamento.

Na Figura 18, pode-se observar as sementes de açaí após obtenção da celulose e  $\alpha$ -celulose, formas e com cavidades nas regiões amorfas da celulose (A) e na  $\alpha$ -celulose (B) observa-se a predominância de fibras degradadas de sementes de açaí.

Figura 18: Fotomicroscopia da celulose tratada (A),  $\alpha$ -celulose (B) de açaí.



## 6.6 Planejamento Fatorial para o Pré-Tratamento Ácido

No início de qualquer pesquisa, é sempre importante saber quais variáveis são mais importantes, sendo também necessário definir os limites superior e inferior dos parâmetros a serem analisados, para que ao final do experimento se atinja o ótimo para a variável resposta. Para esse experimento, foi definido o seguinte planejamento fatorial, conforme matriz experimental apresentada na tabela 11.

### 6.6.1 Matriz Experimental

O planejamento fatorial de  $2^3$  com três pontos centrais foi executada no programa Estatística, gerando a matriz conforme tabela 11, e os resultados da variável resposta (manose) foram obtidos à partir da execução dos experimentos e quantificados em HPLC-RID.

Tabela 7: Planejamento Fatorial para Meio de Fermentação com Hidrolisado (Matriz de Experimentos).

Matriz de Experimentos e Resposta (Manose)				
	S:L	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	Tempo	Manose
1	1:40	0,5	30	1,5
2	1:20	0,5	30	3,2
3	1:40	1,0	30	2,7
4	1:20	1,0	30	6,1
5	1:40	0,5	60	2,6
6	1:20	0,5	60	5,0
7	1:40	1,0	60	3,4
8	1:20	1,0	60	7,2
9	1:26,6	0,75	45	4,3
10	1:26,6	0,75	45	4,7
11	1:26,6	0,75	45	4,7

### 6.6.2 Análise Estatística de Variância (ANOVA)

A análise estatística da variância (ANOVA) (Tabela 12), obtida pelo planejamento fatorial foi gerada a partir dos resultados obtidos no Statistica.

Tabela 8: Análise estatística Anova.

Factor	ANOVA; Var.:Manose; R <sup>2</sup> = 0,96709; R <sup>2</sup> ajustado: 0,89031 (Spreadsheet2) 2**(3-0) design; MS Pure Error=0,0533333 DV: Manose				
	SS	df	MS	F	p
(1)S:L	15,96125	1	15,96125	299,2734	0,003325
(2)[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	6,30125	1	6,30125	118,1484	0,008358
(3)Tempo	2,76125	1	2,76125	51,7734	0,018773
1 by 2	1,20125	1	1,20125	22,5234	0,041644
1 by 3	0,15125	1	0,15125	2,8359	0,234213
2 by 3	0,15125	1	0,15125	2,8359	0,234213
1*2*3	0,01125	1	0,01125	0,2109	0,691121
Lack of Fit	0,79640	1	0,79640	14,9325	0,060913
Pure Error	0,10667	2	0,05333		
Total SS	27,44182	10			

Estes resultados da análise de variância (Anova) para modelo fatorial 2<sup>3</sup>, design com três pontos centrais, e como variável de resposta a concentração de manose fornecidos pelo *software* Estatística, resultou nos seguintes coeficientes de determinação R<sup>2</sup>=0,96709; R<sup>2</sup> ajustado=0,89031 (Spreadsheet2): O valor de R<sup>2</sup> é alto (aproximadamente 96.7%), indicando que o modelo explica uma grande parte da variabilidade nos dados, observada na variável de resposta (concentração de manose). O valor de R<sup>2</sup> ajustado é 0,89031, que leva em consideração o número de preditores no modelo, para penalizar a inclusão desnecessárias de variáveis. Os valores de *p* inferiores a 0,05 indicam que os termos de modelo são significativos.

No tocante à relação sólido:líquido (1), à concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2) e o tempo de pré-tratamento (3), cada um desses fatores são estatisticamente significativos na otimização do pré-tratamento ácido do resíduo do processamento do açaí, pois os valores de *p* são todos menores que 0,05. No entanto, a maior concentração de manose teve como indicativo a relação sólido:líquido, apresentando a maior soma dos quadrados dos fatores (SS) e média quadrática (MS) de 15,96.

O teste F para cada fator é usado para determinar se a variabilidade nas médias dos grupos é significativa em relação à variabilidade dentro dos grupos, neste experimento foi de 14,9.

Em relação as interações entre os fatores: 1 by 2, 1 by 3, 2 by 3, apenas a relação entre (1) e (2) (1 by 2), ou seja, entre a relação sólido:líquido (1) e a concentração de ácido (2) foi estatisticamente significativa. As demais interações não foram significativas, tendo os valores de *p* > 0,05. A interação de todos os fatores em conjunto (1\*2\*3) não se mostrou estatisticamente significativa.

A análise do *Lack of Fit* que avalia se o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, sugere que o modelo precisa ser melhorado, através de um novo planejamento experimental em faixas mais amplas, em particular da relação S:L, como mostrado mais adiante no Gráfico de Pareto.

No que concerne ao Erro Puro (*MS Pure Error*), o valor relatado fornecido pelo *software* foi de 0,5333. Este é o erro puro médio quadrático, que indica a variabilidade não explicada pelo modelo. Pode-se notar pelo valor ser baixo, indicação de menor variabilidade.

No ensaio em que foi utilizado maior concentração de sólido:líquido, obteve-se a maior concentração de manose, estando acima de 7,0 g/L (experimento 7) e acima de 4,0 g/L nos pontos centrais (experimento 9,10 e 11). No entanto, para uma condução de experimento com melhores resultados, é necessário ajustar os ensaios, considerando os indicativos estatísticos.

### 6.6.3 Diagrama de Pareto

O Diagrama de Pareto (DP) é uma ferramenta útil nas análises estatísticas, especialmente em quando se pretende realizar experimentos de qualidade. O DP é uma representação gráfica que mostra a distribuição de frequência de dados em ordem decrescente, destacando os elementos mais significativos. Na prática, o diagrama de Pareto é construído da seguinte forma: (i) coleta de dados; (ii) cálculo das frequências; (iii) ordenação dos dados e (iv) construção do Diagrama.

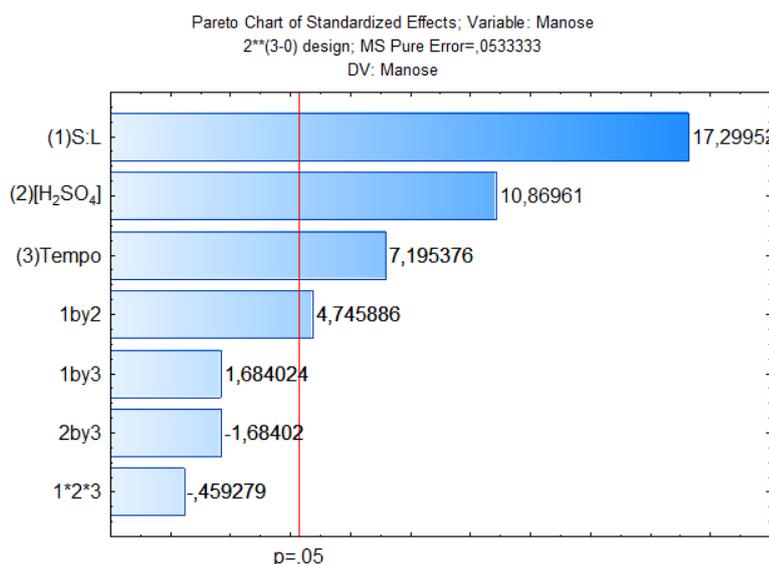
No diagrama de Pareto, as categorias são representadas no eixo horizontal (x) e as frequências no eixo vertical (y). Um gráfico de barras é usado, onde as barras são dispostas em ordem decrescente de altura, da esquerda para a direita. Além disso, uma linha acumulada é plotada, mostrando a porcentagem cumulativa das frequências.

O diagrama de Pareto é valioso porque ajuda na priorização de esforços de melhoria. Ao focar nos poucos problemas ou causas que têm o maior impacto, os recursos podem ser direcionados de forma mais eficaz para obter melhorias significativas na qualidade ou eficiência do processo. Isso é fundamental em experimentos onde a maximização dos resultados é objetivo importante.

Os níveis dos fatores (S:L, [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], Tempo) são importantes para entender como as mudanças de seus valores afetam a variável de resposta (manose). Os efeitos principais (1, 2, 3) indicam a influência de cada fator individualmente na resposta. Neste caso, o fator S:L (1) tem o efeito mais importante (maior magnitude), enquanto os outros dois fatores ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] e

Tempo) têm efeitos menores, embora também importantes. O efeito apresentado através do diagrama de Pareto (Figura 19) revela a importância estatística mais relevante dos fatores e interações entre eles e o maior efeito positivo foi gerado pela concentração sólido:líquido, seguido pelo efeito da solução de concentração de  $H_2SO_4$  e do tempo de pré-tratamento, sugerindo um aumento na concentração destes em um próximo planejamento.

Figura 19: Diagrama de Pareto resultado do Planejamento Experimental do Pré-tratamento Ácido das Sementes de Açaí.



As interações entre fatores (1 by 2, 1 by 3, 2 by 3, 1\*2\*3) podem representar efeito cooperativo (sinérgico) ou antagônico. Uma interação significativa pode indicar que o efeito de um fator na resposta depende do nível de outro fator. A interação 1\*2\*3 é significativa (-4,59), indicando uma interação complexa entre os três fatores.

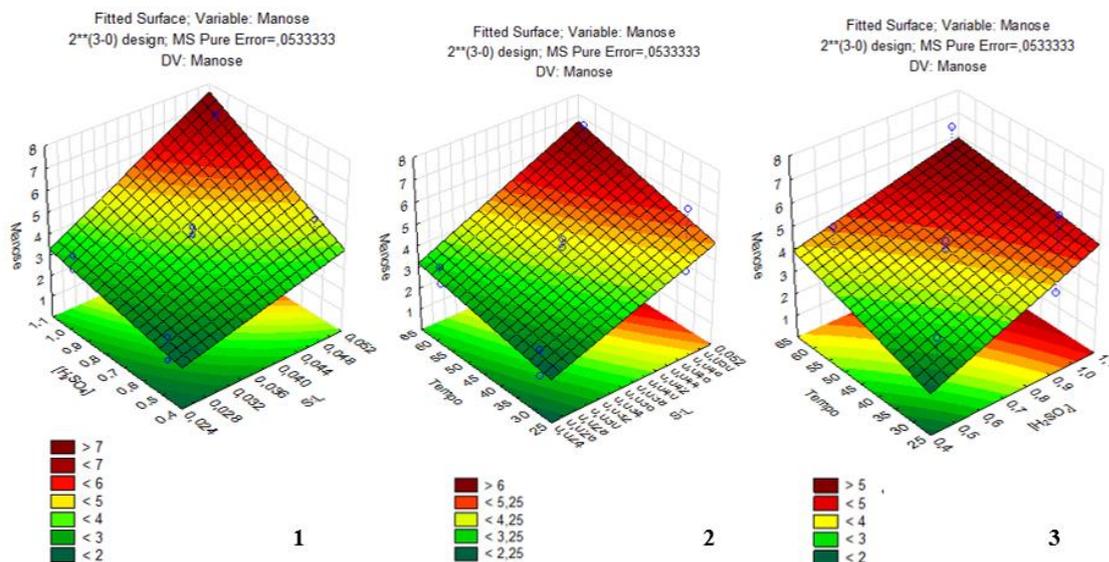
Como a magnitude dos fatores isoladamente foi acima do valor de  $p$  de 0,05, significando que os resultados apresentam confiabilidade acima de 95%, é possível considerar os resultados como estatisticamente significativos, indicando que os efeitos observados não são o resultado do acaso.

#### 6.6.4 Superfície de Resposta

Os gráficos de superfície de resposta tridimensionais (3D) foram gerados para verificar a interação entre as variáveis: concentração de ácido e relação sólido/líquido; relação sólido/líquido e tempo, e concentração de ácido e tempo. As curvas de superfície de resposta para manose indicam que é necessário estabelecer níveis máximos para as combinações como mostrado na figura 20, o que não foi completamente atingido com os níveis definidos no planejamento experimental. De toda a forma o planejamento sinaliza para

que se aumente a faixa dos níveis superiores dos fatores envolvidos na otimização do pré-tratamento das sementes de açaí com vistas a produzir meios prontamente fermentáveis.

Figura 20: Superfície de resposta: interação entre (1) concentração de ácido e relação sólido/líquido na produção de manose; (2) interação entre o tempo e a relação sólido/líquido. (3) interação entre a concentração de ácido e tempo.



O pré-tratamento ácido tem a tendência de incrementar a remoção de hemicelulose, liberando os açúcares no hidrolisado e suas proporções variam conforme a temperatura, o tempo e a concentração do ácido utilizados (WYMAN *et al.* 2013)

## 6.7 Produção de Ácidos Orgânicos

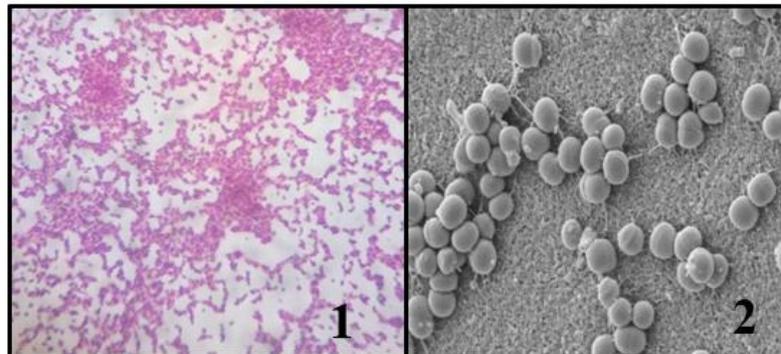
### 6.7.1 Morfologia da Bactéria *Actinobacillus succinogenes*.

As primeiras atividades realizadas com a cepa do microrganismo produtor de ácidos orgânicos foram relativas à verificação da sua morfologia, ou seja, se estavam em conformidade com a descrição para *A. succinogenes* por meio de teste Gram.

Primeiramente, por meio de microscopia óptica, durante os estudos de crescimento celular para criopreservação, foram efetuadas observações com o intuito de monitorar a pureza da cultura. A Figura 21 (2) exibe a fotomicrografia de várias colônias de células, mediante o uso da técnica colorimétrica de Gram, verificando-se a coloração rosácea e confirmando composição e textura da bactéria do tipo Gram (-), de acordo com a constituição

da parede celular de *Actinobacillus succinogenes*. No entanto, não foi possível confirmar com clareza a morfologia do tipo bastonetes. Foi, então, necessário realizar uma outra técnica para confirmar a morfologia das células bacterianas, empregando a microscopia eletrônica de varredura, tendo sido revelada a forma de cocos.

Figura 21: Células de *A. succinogenes* visualizadas em microscópio com aumento de 1000 vezes pela técnica Gram (1); Microscopia eletrônica de varredura da bactéria produtora de ácido orgânicos (2).



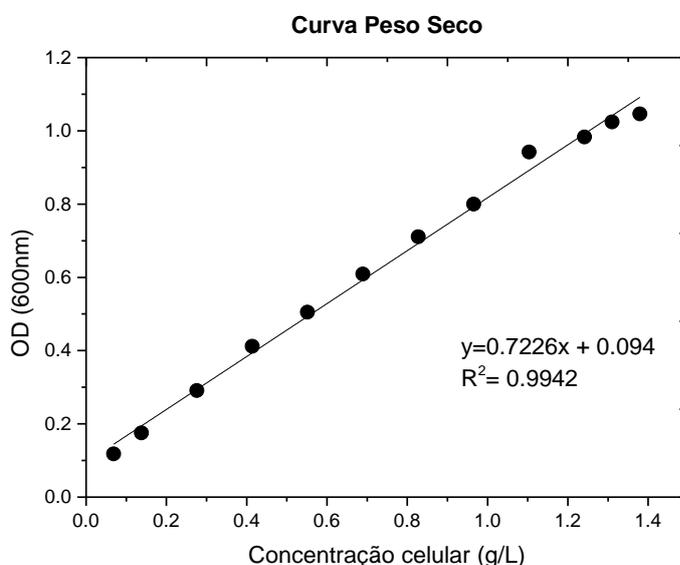
Guettler et al. (1999) descreveram *Actinobacillus succinogenes* como um microrganismo cuja forma de suas células é do tipo bastonetes, não móvel, não formador de esporos, anaeróbico facultativo e pleomórfico. A cepa estudada por esses autores apresentou também a forma cocóide, analogamente a cepa utilizada no presente trabalho. Assim, *A. succinogenes* apresenta o que se denomina na Microbiologia de polimorfismo, termo usado para descrever bactérias que podem assumir diferentes formas morfológicas, como bastonetes (bacilos) e cocos, dependendo das condições de cultivo. Portanto, bactérias polimorfas podem exibir uma variedade de formas celulares em resposta ao ambiente em que estão sendo cultivadas bem como ao seu estado fisiológico. Isso pode incluir a capacidade de alternar entre formas de bastonete e cocos em diferentes condições de cultivo.

### 6.7.2. Curva Padrão entre Concentração Celular (Peso Seco) e Absorvância

A etapa de propagação celular é importante para a produção de células que serão inoculadas na etapa de fermentação, é também para verificar se o microrganismo está adequadamente aclimatado ao meio de cultivo em que está sendo crescido. Com o objetivo de verificar esses pontos, a propagação celular (ativação e pré-inóculo) foi realizada com o monitoramento do crescimento celular. Para tal, foi levantada uma curva de calibração entre densidade ótica (absorvância) a 600 nm e peso seco (Figura 22) que, de acordo com a lei de

Lambert-Beer, estabelece uma proporcionalidade direta entre esses dois métodos de quantificação celular, em faixas definidas de validade, obviamente.

Figura 22: Curva de calibração entre absorvância e peso seco da bactéria *Actinobacillus succinogenes*.

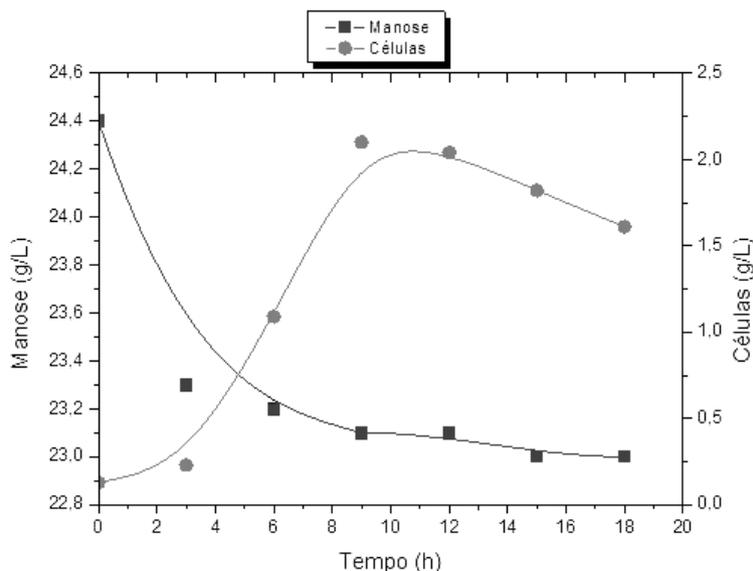


### 6.7.3. Cinética de Crescimento da Bactéria *Actinobacillus succinogenes* em Meio Quimicamente Definido

A curva do crescimento bacteriano em relação ao consumo da manose fonte de carbono, fornece informações valiosas sobre a relação entre o crescimento microbiano e a disponibilidade de um substrato específico, neste caso, a manose no tocante à habilidade de *A. succinogenes* em consumir manose para a sua plasticidade celular. Desta forma consegue-se inicialmente provar o conceito relacionado à utilização do substrato/fonte de carbono mais abundante no resíduo objeto dessa dissertação de mestrado.

A concentração celular atinge o valor máximo de 2,1 g/L em 9 horas de cultivo. Esse crescimento expressivo não ocorreu apenas pelo consumo de manose (consumo percentual de 6,7%), na medida em que o meio básico para o crescimento bacteriano foi o TSB (*Trypticase Soy Broth*). Esse meio é de utilização geral para cultura de microrganismos exigentes e não exigentes. Os digeridos enzimáticos de caseína e soja fornecem os aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas complexas, e a dextrose entra na composição como fonte de energia.

Figura 23: Cinética de Crescimento de *Actinobacillus succinogenes* e consumo de manose.



Assim, o crescimento bacteriano apreciável não se deve apenas à manose como fonte de carbono. Certamente outros componentes do meio foram consumidos para suportar o a incorporação de carbono à massa celular, tendo em vista ser o TSB um meio rico em nutrientes para a célula. A taxa específica da bactéria neste meio foi de  $0,287 \text{ h}^{-1}$  e a produtividade volumétrica de  $0,21 \text{ g/L.h}$ . De toda forma, esse ensaio permitiu provar o conceito da habilidade da cepa em estudo consumir o principal açúcar do resíduo do açúcar.

Após 12 horas de crescimento celular observa-se redução na concentração celular decorrente da morte das células.

A morte de células pode ocorrer por várias de razões, muitas das quais estão relacionadas às condições ambientais, ao estado fisiológico das células e a fatores externos. Algumas das causas comuns são elencadas na sequência: (i) esgotamento de nutrientes; (ii) acúmulo de produtos metabólicos; (iii) acidez do meio: a acidificação do meio de crescimento devido ao acúmulo de metabólitos pode ser prejudicial para o crescimento das células e sua sobrevivência, sendo esta a razão mais provável para o declínio da concentração celular no presente trabalho; (iv) contaminação microbiana; (v) estresse oxidativo; (vi) lesões físicas ou mecânicas, como agitação excessiva e (vii) senescência celular.

Esses são apenas alguns exemplos das muitas causas possíveis da morte celular em meios de crescimento. A compreensão desses fatores e o controle adequado das condições de cultura são essenciais para otimizar o crescimento celular e garantir o sucesso de experimentos em cultura celular.

#### 6.7.4 Estudo Preliminar da Fermentabilidade em Meio Quimicamente Definido para Obtenção de Ácidos.

Inicialmente foram conduzidos ensaios para se avaliar a capacidade da bactéria em fermentar manose como substrato em meio quimicamente definido, cuja composição está descrita na seção (4.4.1.2). Para inoculação dos meios a concentração volumétrica de 10% (v/v) de células de um cultivo anterior (pré-inóculo) foi utilizada. Variou-se apenas a concentração inicial de manose, em 4 ensaios distintos (Tabela 10).

Depreende-se pelo perfil de ácidos orgânicos produzidos que a bactéria produziu vários ácidos orgânicos e o metabolismo é tipicamente heterofermentativo. Embora a redução percentual de manose tenha sido baixa, variando de 7,83% a 11,45%, os resultados exibidos na Tabela 10 demonstram a capacidade heterofermentativa da bactéria *Actinobacillus succinogenes*, que produziu os ácidos succínico, láctico, fórmico, acético e propiônico com concentrações máximas obtidas em diferentes tempos de processo. Destaca-se a produção majoritária do ácido fórmico que atingiu maior concentração quando comparada aos demais.

Tabela 9: Avaliação da fermentabilidade de manose como substrato por *Actinobacillus succinogenes*.

S <sub>i</sub> (g/L) (manose)	AS <sub>máx</sub> (g/L)	AL <sub>máx</sub> (g/L)	AF <sub>máx</sub> (g/L)	AA <sub>máx</sub> (g/L)	AP <sub>máx</sub> (g/L)	AO <sub>totais</sub> (g/L)	Y <sub>AO/Si</sub> (g/g)
15,4	0,4	0,6	4,3	0,4	0,2	5,9	0,383
28,1	0,4	0,5	2,6	0,8	0,1	4,4	0,156
40,1	0,4	0,5	1,1	0,7	0,1	2,8	0,070
48,9	0,4	0,6	2,4	0,4	0,1	3,9	0,079

AS<sub>máx</sub>: concentração máxima de ácido succínico.

AL<sub>máx</sub>: concentração máxima de ácido láctico.

AF<sub>máx</sub>: concentração máxima de ácido fórmico.

AA<sub>máx</sub>: concentração máxima de ácido acético.

AP<sub>máx</sub>: concentração máxima de ácido propiônico.

AO<sub>totais</sub>: concentração de ácidos orgânicos totais.

Y<sub>AO/Si</sub>: fator de rendimento de ácidos orgânicos por manose inicial.

A heterofermentação é um processo microbiano em que vários produtos são gerados a partir de uma única fonte de substrato. Esse tipo de fermentação é frequentemente observado em alguns grupos de bactérias, como as bactérias lácticas, que são conhecidas por sua capacidade de fermentar uma variedade de açúcares e, dependendo da condição de cultivo, uma variedade de produtos, como ácido láctico, álcool etílico, dióxido de carbono, outros ácidos orgânicos e compostos voláteis.

Observa-se, ainda, a redução do fator de rendimento de ácidos orgânicos produzidos por manose inicialmente oferecida ( $Y_{AO/Si}$ ). A inibição do metabolismo pela concentração de substrato em células bacterianas é um fenômeno crucial que impacta diretamente a produção de ácidos orgânicos. Quando a concentração de substrato inicial aumenta, espera-se que a produção de ácidos orgânicos também aumente. No entanto, em alguns casos, observa-se uma redução no rendimento dos ácidos orgânicos conforme a concentração de substrato inicial se eleva. A inibição do metabolismo microbiano envolve fenômenos bioquímicos complexos, como a repressão catabólica, a inibição entre o substrato e um produto intermediário pelo mesmo sítio ativo das enzimas, ou ainda a ligação do produto formado em um local diferente do sítio ativo da enzima.

Adicionalmente, há que se considerar o aumento da pressão osmótica do meio externo decorrente do aumento da concentração do substrato, o que leva ao comprometimento da integridade celular, levando a perda de sua viabilidade (Maria et al. 2024).

Esse efeito pode ser atribuído à inibição competitiva ou à inibição não competitiva. Na inibição competitiva, a concentração elevada de substrato causa a competição entre o substrato e um produto intermediário pelo mesmo sítio ativo na enzima. Como resultado, a enzima se torna menos eficaz na conversão do substrato em produto, diminuindo o rendimento global.

Para contornar esses problemas, estratégias como a otimização das condições de cultivo, a modificação genética das enzimas envolvidas no metabolismo e a utilização de métodos de controle do processo, como a batelada alimentada, podem ser empregadas. Essas abordagens visam mitigar os efeitos da inibição do metabolismo, maximizando assim o rendimento da produção de ácidos orgânicos em células bacterianas.

Em trabalho futuro sugere-se investigar com maior profundidade as baixas concentrações dos ácidos orgânicos produzidos e o porquê do ácido succínico que dá o nome a espécie utilizada nesses ensaios não ter sido acumulado de forma predominante nessas condições ensaiadas.

*Actinobacillus succinogenes* é um produtor expressivo de ácido succínico, no entanto na condução dos ensaios aqui relatados a sua produção não logrou muito êxito. Xu et al. (2022) sugerem que a aclimatação do microrganismo pode influenciar, ou, no caso do presente trabalho, ter influenciado a inibição da taxa de captação de açúcar pela bactéria, resultando no declínio do fluxo metabólico que converte açúcares em ácido succínico. Por outro lado, as vias de síntese também podem ter sido inibidas. A utilização de glicose e xilose na produção de ácido succínico por *A. succinogenes* tem mais ocorrências na literatura

especializada do que utilização de manose.

Outro aspecto importante a ser considerado relaciona-se ao fato de que a condução dos experimentos se deu na ausência de suprimento de CO<sub>2</sub>. É fato conhecido que as bactérias produtoras de ácido succínico, particularmente *A. succinogenes*, são capnofílica, isto é, crescem em ambientes com altas concentrações de CO<sub>2</sub>, que é fixado pela enzima fosfoenol piruvato (PEP) carboxiquinase, no metabolismo de glicídios com essa bactéria. Assim, sugere-se que em próximos experimentos, se alimente o sistema com CO<sub>2</sub>, a fim de se deslocar o fluxo metabólico no sentido da produção de ácido succínico em detrimento dos outros ácidos orgânicos (Jr. 2024).

#### **6.7.5 Estudo Preliminar da Fermentabilidade em Meio Hidrolisado do Resíduo de Açaí.**

Foi realizado um experimento de fermentação, com intuito de validar a fermentabilidade do hidrolisado ácido das sementes de açaí na condição que promoveu a maior concentração de manose (7,2 g/L), alcançada com a relação S:L de 1:20; concentração de ácido sulfúrico 1,0 % v/v e tempo de 60 minutos (Tabela 8 - corrida 8). O hidrolisado ácido nessa condição foi neutralizado e adicionado de TSB e extrato de levedura (ver seção 4.5.4). Após inoculação, a fermentação se transcorreu por 48 horas, quando amostras foram retiradas para avaliar o perfil dos produtos.

Embora haja vários métodos de pré-tratamento do material lignocelulósico, o planejamento experimental ajudou a priorizar a maximização dos melhores resultados de liberação de manose, resultados próximos também foram obtido por GOMES (2018), com a máxima liberação de glicose (8,4g/L), quando a hidrólise foi realizada nas condições H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,9% por 35min em autoclave 121°C, tendo como material lignocelulósico a palha da cana-de-açúcar.

Na Tabela 11, estão apresentados os valores das concentrações dos ácidos obtidos, na qual se verifica a produção majoritária de ácido succínico (2,9 g/L) e ácido propiônico (3,3 g/L). Estes valores diferem daqueles do meio quimicamente definido, muito provavelmente em função do grau de redutibilidade que se refere à capacidade de um meio de cultivo de fornecer elétrons para os microrganismos, o que influencia diretamente seu crescimento e atividade metabólica.

O grau de redutibilidade de um meio de cultivo é determinado pela presença e disponibilidade de substâncias que podem ser utilizadas como doadoras ou receptoras de elétrons pelos microrganismos. Por exemplo, um meio de cultivo rico em oxigênio dissolvido

e nutrientes solúveis pode ser considerado altamente oxidado, pois fornece uma fonte abundante de elétrons na forma de oxigênio para microrganismos aeróbicos. Por outro lado, um meio pobre em oxigênio e rico em compostos orgânicos complexos pode ser considerado altamente redutor, pois oferece pouca ou nenhuma disponibilidade de oxigênio e, portanto, os microrganismos anaeróbicos podem utilizar os compostos orgânicos como receptores de elétrons.

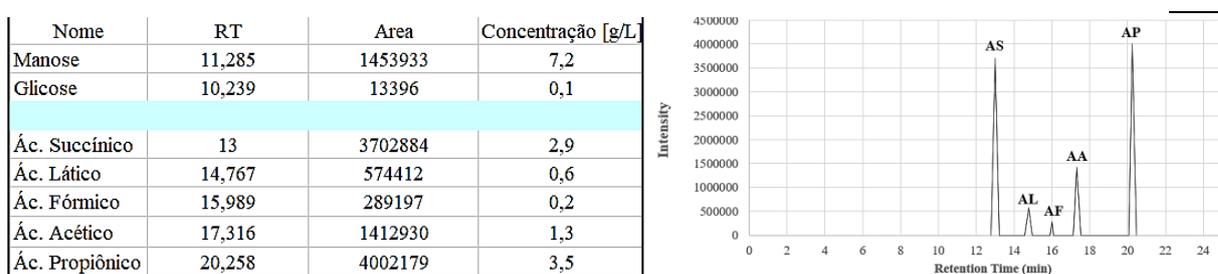
O grau de redutibilidade dos glicídios está diretamente relacionado à sua capacidade de doar elétrons em reações químicas. Muitos glicídios apresentam poder redutor, o que significa que podem ser oxidados, doando elétrons para outras substâncias.

A figura 24 exibe os ácidos produzidos na fermentação do hidrolisado das sementes de açaí para a melhor condição do planejamento experimental, comprovando o caráter heterofermentativo da bactéria agente do bioprocessamento em tela.

Tabela 10: Fermentabilidade do hidrolisado ácido das sementes de açaí na condição que promoveu a maior concentração de manose.

$S_i$ (g/L) (manose)	$AS_{máx}$ (g/L)	$AL_{máx}$ (g/L)	$AF_{máx}$ (g/L)	$AA_{máx}$ (g/L)	$AP_{máx}$ (g/L)	$AO_{totais}$ (g/L)	$Y_{AO/S_i}$ (g/g)
7,2	2,9	0,6	0,2	1,3	3,5	8,5	1,18

Figura 24: Cromatograma da fermentação do hidrolisado ácido das sementes de açaí referente ao ensaio apresentado na Tabela 11.



Em uma heterofermentação, vários produtos podem ser formados a partir da glicose, dependendo das condições específicas da reação e dos microrganismos envolvidos. A probabilidade de formação preferencial de determinados produtos pode ser influenciada pelo grau de redutibilidade da glicose e pelas afinidades dos diferentes componentes da via metabólica pela glicose e seus produtos intermediários.

No entanto, embora o grau de redutibilidade da manose possa influenciar a velocidade e a direção das reações bioquímicas, a probabilidade de formação preferencial de produtos em uma heterofermentação também dependerá de uma série de outros fatores, tornando difícil prever com precisão qual produto será dominante com base apenas no grau de redutibilidade

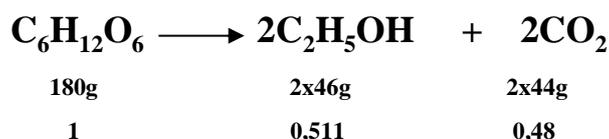
desse substrato.

Além disso, a biologia celular e molecular envolve uma série de mecanismos de controle e regulação, como retroalimentação (feedback), modulação alostérica, regulação por hormônios e expressão gênica, que podem influenciar significativamente os caminhos metabólicos e as taxas de produção de diferentes produtos. Assim, mesmo com um conhecimento detalhado das propriedades bioquímicas dos substratos e enzimas envolvidos, muitas vezes é necessário considerar uma variedade de fatores e realizar experimentos empíricos para entender com mais profundidade as respostas dos sistemas biológicos.

## 6.8 Produção de Etanol com Base na Fermentabilidade de Manose

A utilização de matérias-primas alternativas para a produção de etanol e seus subprodutos têm sido vista como uma possível solução para enfrentar os desafios relacionados à crise energética. Espera-se que com custos de conversão reduzidos e os rendimentos aumentados, essas abordagens tornem-se ainda mais atrativas.

A fermentação alcoólica do hidrolisado ácido, como o das sementes de açaí, por ação de leveduras, é um processo importante e os principais produtos obtidos em proporções equimolares são: o etanol e o dióxido de carbono conforme equação estequiométrica.



Para cada 180 g de glicose ou hexose, são produzidos 92 g de etanol, o que equivale a 51,1 g de etanol por kg de glicose. O coeficiente de Gay-Lussac (rendimento teórico) é de 51,1% em massa, sendo este utilizado para o cálculo da taxa de conversão de glicose em etanol (JACKMAN, 1991).

Em todos os experimentos de fermentação alcoólica utilizou-se o fermentômetro, sistema largamente empregado nas indústrias viti-vinícolas. Seu funcionamento é simples e de resposta rápida, na medida em que se mede gravimetricamente a liberação do CO<sub>2</sub>, que se relaciona estequiometricamente com o etanol, denominado de “etanol equivalente”. De toda forma o etanol no meio ao final da fermentação também foi medido por HPLC.

### 6.8.1 Avaliação preliminar da Fermentabilidade Alcoólica do Hidrolisado Ácido das Sementes do Açaí.

As sementes de açaí, previamente tratadas com  $H_2SO_4$  diluído, e o pré-tratamento realizado nas seguintes condições (sólido:líquido: 1:10 para as sementes moídas; concentração de  $H_2SO_4$ : 1% (v/v); tempo: 1h; volume: 200mL). Após a hidrólise ácida, o meio foi submetido a fermentação alcoólica, com pH previamente calibrado para 4,5 e inoculado com uma concentração *Saccharomyces cerevisiae* comercial de ( $X_0= 17,5$  g pu/L). Em seguida, o fermentômetro contendo o meio hidrolisado inoculado foi levado para incubadora do tipo shaker, onde ficou sob incubação durante o total desprendimento de  $CO_2$ , na temperatura de  $35^\circ C$  e agitação de 150rpm. Após este período de observação, o conteúdo do frasco foi distribuído em tubos de centrifugação, que foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos, seguindo a quantificação de açúcares e etanol através de HPLC-RID.

Na preparação do ensaio 2- o hidrolisado destinado à fermentação, foi preparado com  $H_2SO_4$  diluído, realizado nas condições (sólido:líquido: 1:10 para as sementes moídas; a concentração de  $H_2SO_4$ : 1%; o tempo: 1h; e o volume: 200mL). Em um segundo momento, duplicou-se a concentração inicial de células (35 g pu/L) e o sistema foi incubado nas mesmas condições do ensaio anterior. A fermentação alcoólica foi através da inoculação de inoculada com 35 g pu/L da levedura descrita comercial, nas mesmas condições de temperatura e agitação.

O acompanhamento cinético desses dois experimentos, estão representados nos gráficos da Figura 25. Os perfis são bastante semelhantes, pois os sistemas foram inoculados com altas densidade celulares, não havendo diferenças significativas nas taxas de fermentação. De toda forma, fica demonstrado a capacidade de *S. cerevisiae* em fermentar o hidrolisado de açaí. Para se lograr maiores concentrações de etanol é imperioso buscar condições a fim de se aumentar a concentração de manose no meio hidrolisado.

De acordo com os dados da Tabela 12, pode-se observar que no primeiro experimento ( $X_0=17,5$  g pu/L), ao final do processo fermentativo houve a conversão da manose inicial levando a produção de 1,27 g/L (EtOH equivalente) e 1,40 g/L de etanol (EtOH HPLC), correspondente à eficiência de fermentação de 88%. Já no segundo experimento, obteve-se praticamente a mesma concentração de etanol do que no caso anterior, o que correspondeu à eficiência de fermentação de 86%, evidenciando que nessas concentrações elevadas de inóculo não há diferenças no desempenho fermentativo da levedura. A produtividade volumétrica de ambos os experimentos foi de 0,7 g/L.h, considerando o tempo em que se

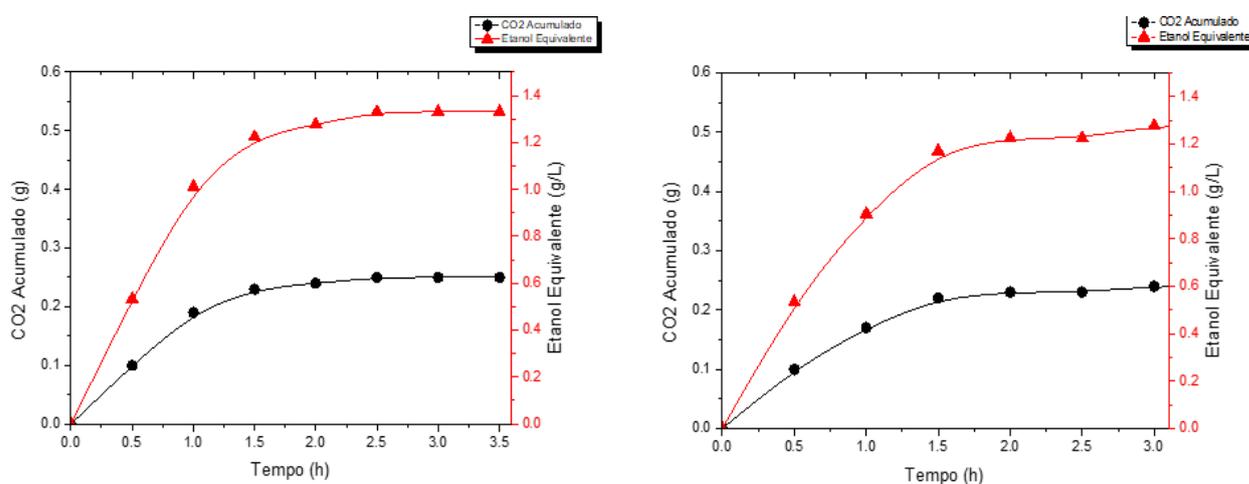
atingiu a concentração máxima de etanol (2 horas).

Tabela 11: Fermentabilidade do hidrolisado de sementes de açaí com duas

Item	$X_0$ (g (pu)/L)	$S_0$ (g/L)	$S_F$ (g/L)	Tempo (h)	CO <sub>2</sub> Acumulado (g)	C(EtOH) Teo (g/L)	C(EtOH) Exp (g/L)	Qp (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)
1	17,5	3,61	0,80	3,5	0,24	1,27 a	1,40 a	0,70 a	0,50 a
2	35,0	3,70	0,70	3,5	0,25	1,33 a	1,40 a	0,70 a	0,50 a

concentrações de inóculo.

Figura 25: Produção de etanol a partir de hidrolisado de sementes de açaí. Inóculo de 17,5 g pu/L (à esquerda) e 35,0 pu/L (à direita).



Nota: \*Valores apresentados (n=2). Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de T-Student ( $p > 0,05$ ).

Avaliando os resultados do segundo experimento, pode-se perceber que mesmo aumentando a concentração de células para 35 g/L, a produção de etanol ficou limitada a concentração inicial de substrato, semelhante à do primeiro ensaio. A taxa de produção específica ( $Q_p$ ) e a eficiência da fermentação ( $Y_{P/S}$ ) também se mantiveram igual ao primeiro experimento. Ao comparar com resultados de Liu et al. (2015), que obteve concentração de etanol de 5,8g/L do bagaço da cana que já tem um bioprocesso consolidado, foi bem promissor para ensaios preliminares e consolidar melhores resultados para o resíduo de açaí. De toda forma, o conceito foi provado e a fermentabilidade demonstrada.

Esses resultados sugerem uma eficiente fermentação alcoólica das sementes de açaí, com elevado rendimento de etanol em relação ao substrato consumido. Para avaliar se havia

diferenças significativas entre elas, utilizou-se análise estatística Teste t-Student para amostras independentes: comparando as médias de duas amostras independentes do (Ensaio 1 vs Ensaio 2) de produção de Etanol. Em um intervalo de confiança de 95%, a diferença entre as médias é mínima, indicando que não houve uma diferença estatisticamente significativa na produção de etanol entre os dois ensaios. Assim, para se aumentar a produção de etanol, há necessidade de considerar o aumento da concentração de manose no hidrolisado, para se alcançar maior produção de etanol, conforme também descrito por (CORDEIRO, 2016).

### 6.8.2 Avaliação da Capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* em Fermentar Manose em meio quimicamente definido.

Nessa série de experimentos, três concentrações de manose no meio foram investigadas: 50, 100 e 150 g/L com concentrações de inóculo de 25; 22,5 e 37,5 g/L, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em frascos de fermentômetro e o acompanhamento realizado por medidas gravimétricas. O objetivo foi avaliar o desempenho da levedura em fermentar manose eficientemente à semelhança da fermentação do seu isômero glicose.

Os perfis cinéticos desses três ensaios estão apresentados a seguir, assim como a tabela 13 que exhibe as variáveis de resposta das fermentações conduzidas.

Figura 26: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \approx 50$  g/L).

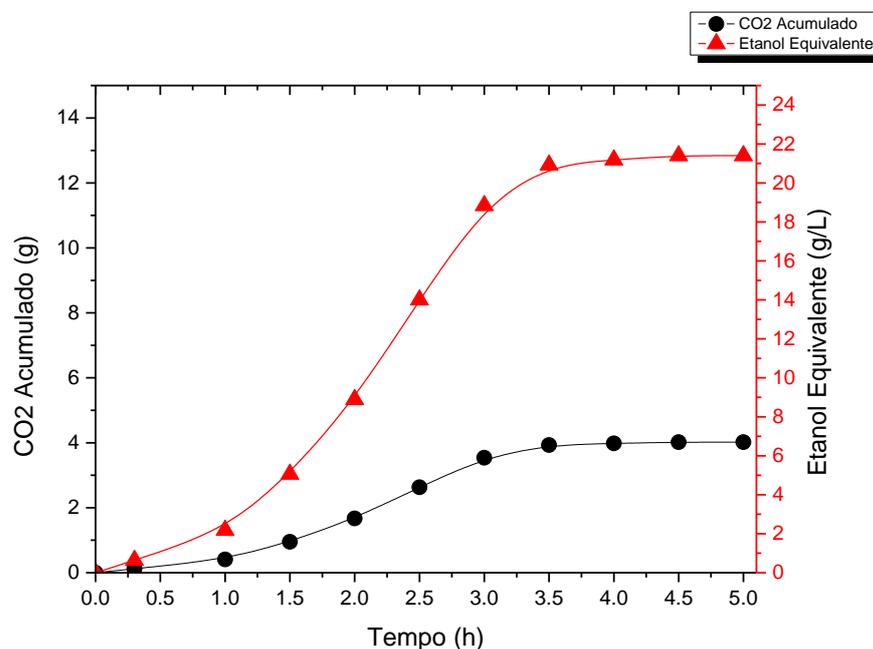


Figura 27: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \cong 100$  g/L).

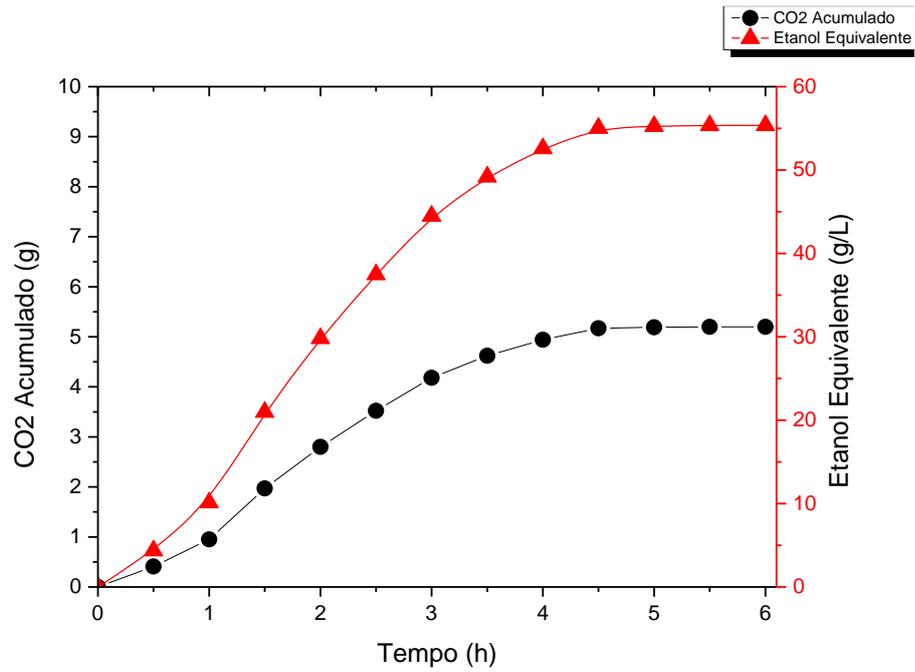


Figura 28: Fermentação alcoólica em meio quimicamente definido ( $S_0 \cong 150$  g/L).

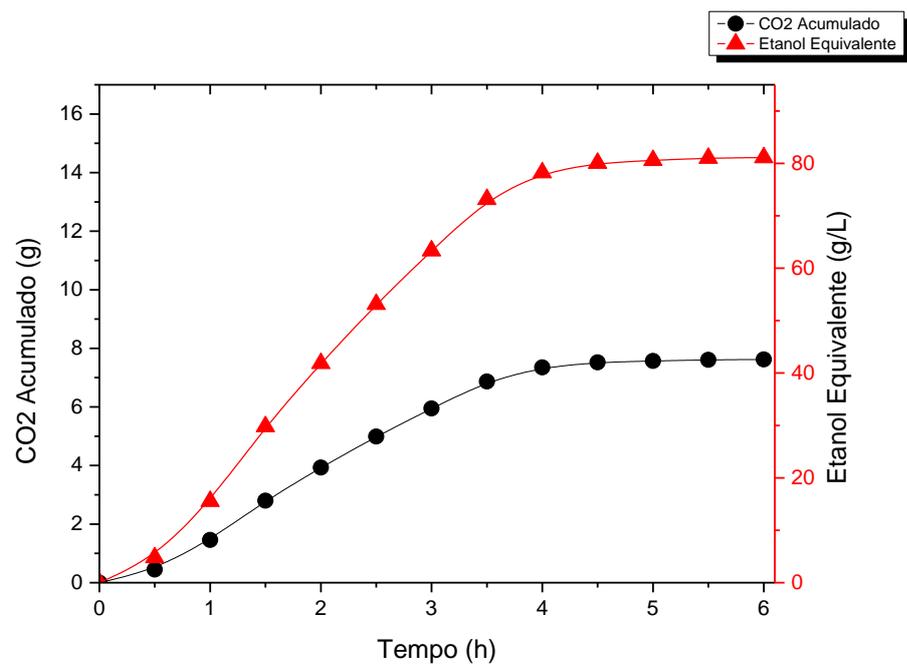


Tabela 12: Variáveis de resposta da fermentação alcoólica de manose em meio quimicamente definido.

Item	X <sub>0</sub> (g pu/L)	S <sub>0</sub> (g/L)	S <sub>F</sub> (g/L)	Tempo (h)	CO <sub>2</sub> Acumulado (g)	EtOH <sub>equiv.</sub> [g/L]	Q <sub>P</sub> [g/L.h]	Y <sub>P/S</sub> (g/g)
1	25,0	50	0	5	4,02	21,40 a	6,11 a	0,428 a
2	22,5	100	0	6	5,20	55,35 b	12,30 b	0,550 b
3	37,5	150	0	6	7,62	81,12 c	18,03 c	0,540 b

Nota: \*Valores apresentados (n=3). Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente significativos de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Ressalta-se que em todos os experimentos houve um consumo total de substrato, e concentrações progressivamente aumentadas com o aumento da concentração inicial de manose. A capacidade de fermentar manose, principal açúcar no hidrolisado de resíduos de açaí, foi notável, com valores de produtividade volumétrica variando de 6,11 a 18,03 g/L.h, o que consideramos surpreendente, considerando que a produtividade da fermentação alcoólica industrial (de sacarose) varia entre 5 e 8 g/L.h (Pereira Jr. 2024)

Outro dado interessante refere-se aos fatores de rendimento de etanol em relação à manose consumida ( $Y_{P/S}$ ). Na concentração mais baixa de manose (50 g/L),  $Y_{P/S}$  correspondeu à 84% de eficiência de fermentação. À medida que se aumentou a concentração inicial de manose a eficiência de fermentação foi superior ao máximo obtível estequiometricamente, o que pode ser interpretado como eficiência de 100%.

A ideia de uma eficiência de fermentação superior a 100% pode parecer contraintuitiva à primeira vista, já que implica em produzir mais produto do que o esperado teoricamente. No entanto, isso pode ocorrer por várias razões, algumas das quais estão relacionadas com a natureza do processo de fermentação e outras com possíveis erros experimentais. Seguem algumas explicações possíveis: (i) perda de água particularmente em se tratando de fermentações rápidas, com grande desprendimento de CO<sub>2</sub>; (ii) falta de precisão das medidas; (iii) formação do produto oriundo de outra fonte que não do substrato principal.

As diferenças observadas nos parâmetros analisados indicam que as Fermentações 2 e 3 apresentaram um desempenho superior em termos de produção. Essas variações podem ser atribuídas as diferentes condições iniciais, como concentração de manose, e ilustram a

importância do controle desses fatores para otimizar o processo fermentativo com o hidrolisado de açaí.

Para comparar os três experimentos, usou-se Teste Tukey, para comparação os três ensaios. Os resultados do teste Tukey indicam que há evidências de diferenças significativas entre os grupos (experimentos) para etanol produzido. Analisando os principais resultados apresentados, utilizando análise estatística de variância ANOVA:

Para os três ensaios de produção de etanol executado no Bioestat, a soma dos quadrados (SQ) foi de 3590. O valor de ( $p$ ), muito próximo de zero, indicou que existe diferença entre a média dos 3 tratamentos. As médias do primeiro tratamento foi 21,39; o segundo de 55,35; o terceiro de 81,12. Os resultados do Teste Tukey mostraram diferenças significativas entre todas as médias pareadas, com valor de  $p < 0,05$ . Em resumo, os resultados indicaram que os tratamentos têm impacto significativo na produção de etanol. Sugerindo que os tratamentos são eficazes em influenciar a produção de etanol.

## 7. CONCLUSÕES

As sementes de açaí processadas apresentaram propriedades físico-químicas que as tornam adequadas para diversas aplicações, como produção de ácidos orgânicos e bioetanol. O pH moderadamente ácido (5,47) é compatível com características típicas do açaí, contribuindo para sua refrescância. A umidade de 7,30% indica boa desidratação, promovendo a preservação do material. O teor de cinzas (1,53%) indica a presença de minerais e potencial para processos fermentativos como fontes de macro e microelementos.

A composição lignocelulósica do resíduo de açaí apresentou 60,42% de holocelulose, 30,8% de  $\alpha$ -celulose e 29,6% de hemicelulose indicando seu elevado potencial para produção de ácidos orgânicos e etanol de segunda geração.

Os resultados também indicaram que a escolha do pré-tratamento deve considerar a concentração de inibidores e o seu impacto potencial no crescimento e atividade do microrganismo, exigindo uma abordagem equilibrada para otimizar os resultados desejados.

Ficou clara, por meio dos gráficos de superfície de resposta, construídos após o planejamento experimental fatorial, a necessidade de se proceder a outro planejamento experimental sequencial, explorando principalmente a relação sólido:líquido visando a obtenção de hidrolisados ricos em manose. Há que se compreender ainda as interações entre os fatores do planejamento para que os meios hidrolisados sejam prontamente fermentáveis, com mínima geração de compostos inibitórios à atividade microbiana.

Os gráficos de superfície de resposta destacam as interações entre as variáveis e indicam que concentrações máximas devem ser estabelecidas para otimizar a produção de manose e que devem ser considerados para futuros trabalhos com os resíduos de açaí.

Diversos ácidos orgânicos foram identificados, tanto em meio quimicamente definido quanto no meio hidrolisado, como ácido succínico, láctico, fórmico, acético e propiônico. As concentrações máximas e os tempos de produção variaram entre eles, sugerindo diferentes perfis metabólicos ao longo da fermentação. Isso destaca a importância de se considerar a consistência e repetibilidade dos experimentos para garantir resultados direcionados. Apesar do potencial do microrganismo *A. succinogenes*, como produtor de ácido succínico, os resultados não foram expressivos. Sugere-se ensaios adicionais para indução e expressão do ácido em destaque e desenvolvimento de processo que incorpore o suprimento de CO<sub>2</sub>, tendo em vista a característica capnófila de *Actinobacillus succinogenes*.

A produção de etanol indicou uma boa concordância entre os resultados experimentais e as expectativas teóricas. Considerando melhores resultados, outros parâmetros podem ser

utilizados para se obter maiores concentrações de manose por meio do pré-tratamento ácido com parâmetros otimizados, a ser aplicado na fermentação alcoólica das sementes de açaí. Deve-se também buscar pelo aproveitamento da fração celulósica das sementes de açaí, tendo em vista seus percentuais elevados, após hidrólise enzimática.

## 8. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE LOPES ANDRADE. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO COMBINADO COM ANTIBIÓTICOS DO NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO [RuCl(NO<sub>2</sub>)(dppb)(4,4'-Mebipy)] NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO COM LUZ AZUL. *Journal of Engineering Research*, n. 2, 2023.

ALEXANDRI, M.; PAPAPOSTOULOU, H.; STRAGIER, L.; et al. Succinic acid production by immobilized cultures using spent sulphite liquor as fermentation medium. *Bioresource Technology*, v. 238, p. 214–222, 2017.

ALINE MACHADO DE CASTRO; PEREIRA JUNIOR, N. PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE CELULASES NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

AN, J.; ADELINA, N. M.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. Effect of roasting pre-treatment of two grafted pine nuts (*Pinus koraiensis*) on yield, color, chemical compositions, antioxidant activity, and oxidative stability of the oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022.

ÁNGEL-ISAZA, J.; MESA-SALGADO, N.; NARVÁEZ-SOLARTE, W. Ácidos orgánicos, una alternativa en la nutrición avícola: una revisión. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2019.

ANTOLINI, E. Catalysts for direct ethanol fuel cells. *Journal of Power Sources*, 2007.

ARUN, K. B.; MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; et al. Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactives and biopolymers. *Industrial Crops and Products*, v. 154, 2020.

ASSIS, I. Z.; MARISUTTI, E.; ROSSI, D. M. Produção biotecnológica de 2,3-butanodiol no contexto de Biorrefinaria. *Revista Cincia, Tecnologia & Ambiente*, v. 11, n. 1, p. e11197, 2021.

ASTROV, V.; GHODSI, M.; GRIEVESON, R.; et al. Russia's invasion of Ukraine: assessment of the humanitarian, economic, and financial impact in the short and medium term. *Springer Berlin Heidelberg*, 2022.

BEN ATITALLAH, I.; ANTONOPOULOU, G.; NTAIKOU, I.; et al. A Comparative Study of Various Pretreatment Approaches for Bio-Ethanol Production from Willow Sawdust, Using Co-Cultures and Mono-Cultures of Different Yeast Strains. *Molecules*, 2022.

AUTOR, S. Succinic Acid Market-2022-2027. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/succinic-acid-market>>. Acesso em: 4/12/2022.

DE AZEVEDO, A. R. G.; MARVILA, M. T.; TAYEH, B. A.; et al. Technological performance of açai natural fibre reinforced cement-based mortars. *Journal of Building Engineering*, v. 33, p. 101675, 2021. Elsevier.

BAI, Y.; DING, X.; ZHAO, Q.; et al. Development of an organic acid compound disinfectant

to control food-borne pathogens and its application in chicken slaughterhouses. *Poultry Science*, 2022.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. DO N. *Experimentação Agrícola*. 2006.

BARBOSA, J. R.; CARVALHO JUNIOR, R. N. DE. Food sustainability trends - How to value the açai production chain for the development of food inputs from its main bioactive ingredients? *Trends in Food Science & Technology*, v. 124, p. 86–95, 2022. Elsevier.

BARLETTA, M.; AVERSA, C.; AYYOOB, M.; et al. Poly(butylene succinate) (PBS): Materials, processing, and industrial applications. *Progress in Polymer Science*, p. 62, 2022.

BARROS, S. DE S.; OLIVEIRA, E. DA S.; PESSOA JR, W. A. G.; ROSAS, A. L. G.; FREITAS, A. E. M. DE; et al. Sementes de açai (*Euterpe precatoria* Mart.) como uma nova fonte alternativa de celulose: Extração e caracterização. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. e31110716661, 2021.

BARROS, S. DE S.; OLIVEIRA, E. DA S.; PESSOA JR, W. A. G.; ROSAS, A. L. G.; DE FREITAS, A. E. M.; et al. Waste açai (*Euterpe precatoria* Mart.) seeds as a new alternative source of cellulose: Extraction and characterization. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2021.

BAUDIN, B. Oligoéléments cofacteurs enzymatiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2021.

BECKER, R. Indicadores de economia verde y ODS. *División de Estadísticas de Naciones Unidas (DENU)*, 2018.

BELLO, S.; LADAKIS, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; et al. Renewable carbon opportunities in the production of succinic acid applying attributional and consequential modelling. *Chemical Engineering Journal*, 2022.

Biorefineries–Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions. *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC*, v. 29, n. 3, 2014.

BOHÓRQUEZ, M. A. M. CARACTERIZAÇÃO DE NANOCELULOSE DO BAGAÇO DE LARANJA E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS VISANDO SEU REAPROVEITAMENTO DURANTE A ETAPA DA HIDRÓLISE DE CELULOSE, 2017. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

BORGES, E. R. DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR *Actinobacillus succinogenes*. , p. 226, 2011. BRASIL. CNPE passa a ter competência para fixar teor de etanolídeo na gasolina. Ministério de Minas e Energia, 2022.

BRØNSTED, J. N.; LOWRY, T. M. Studies on the Theory of Ionization of Water. *Journal of the Chemical Society*, p. 1456–1462, 1923.

BURATTO, R. T.; COCERO, M. J.; MARTÍN, Á. Characterization of industrial açai pulp residues and valorization by microwave-assisted extraction. *Chemical Engineering and*

Processing - Process Intensification, 2021.

BUSTOS, G.; MOLDES, A. B.; CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Influence of the metabolism pathway on lactic acid production from hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates using *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnology Progress*, 2005.

CANTU-JUNGLES, T. M.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Isolation and characterization of a xylan with industrial and biomedical applications from edible açai berries (*Euterpe oleraceae*). *Food Chemistry*, v. 221, p. 1595–1597, 2017. Elsevier.

CAROLINA SALGADO DE OLIVEIRA, A.; VILELA BORGES, S. Poli (Ácido Láctico) Aplicado para Embalagens de Alimentos: Uma Revisão. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 15, n. 1, 2020.

CARVALHO, A. V.; DE ANDRADE MATTIETTO, R.; BECKMAN, J. C. Estudo da estabilidade de polpas de frutas tropicais mistas congeladas utilizadas na formulação de bebidas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 20, 2017.

CASTRO, P. G. DE M. Desenvolvimento de Processo Fermentativo para a Produção de Ácido Propiônico a Partir da Fração Hemicelulósica de Bagaço de Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. , p. 8–13, 2014.

CASTRO, P. G. M.; MAEDA, R. N.; ROCHA, V. A. L.; FERNANDES, R. P.; PEREIRA, N. Improving propionic acid production from a hemicellulosic hydrolysate of sorghum bagasse by means of cell immobilization and sequential batch operation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021.

CHEN, J.; YANG, S.; ALAM, M. A.; et al. Novel biorefining method for succinic acid processed from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 324, 2021.

CONAB. Análise Mensal CONAB. , 2019.

CORDEIRO, M. DE A. ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ (*Euterpe oleraceae* Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL. , 2016.

CORREA, B. A.; PARREIRA, M. C.; MARTINS, J. D. S.; RIBEIRO, R. C.; DA SILVA, E. M. REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS REGIONAIS AGROINDUSTRIAIS DA AMAZÔNIA TOCANTINA COMO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE ALFACE. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 9, n. 1, 2019.

CORREIA, L. A. DA S.; DA SILVA, J. E.; CALIXTO, G. Q.; MELO, D. M. DE A.; BRAGA, R. M. Pachira aquatica fruits shells valorization: Renewables phenolics through analytical pyrolysis study (Py-GC/MS). *Ciencia Rural*, 2022.

DA COSTA CASTRO, C. D. P.; DIAS, C. G. B. T.; DE ASSIS FONSECA FARIA, J. Production and evaluation of recycled polymers from açai fibers. *Materials Research*, v. 13, n. 2, p. 159–163, 2010.

CSÉFALVAY, E.; HAJAS, T.; MIKA, L. T. Environmental sustainability assessment of a

biomass-based chemical industry in the Visegrad countries: Czech Republic, Hungary, Poland, and Slovakia. *Chemical Papers*, 2020.

DEN, W.; SHARMA, V. K.; LEE, M.; NADADUR, G.; VARMA, R. S. Lignocellulosic biomass transformations via greener oxidative pretreatment processes: Access to energy and value added chemicals. *Frontiers in Chemistry*, 2018.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. *Embrapa Instrumentação*, v. 1, p. 13, 2011.

FELIPE, S.; VERONICA, C.; NEI, P. J. Fibras de carbono a partir de lignina: Uma revisão da literatura. *Revista Materia*, v. 20, n. 1, p. 100–114, 2015.

FERONE, M.; RAGANATI, F.; ERCOLE, A.; et al. Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a packed-bed biofilm reactor. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 1, 2018.

FERREIRA MONTEIRO, A.; SANTOS MIGUEZ, I.; PEDRO, J.; et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. *Scientific Reports*, v. 9, p. 10939, 2019.

FERREIRA PEREIRA, J. A.; COTTA COUTINHO, Í. A.; SOARES, E. L.; et al. Morphoanatomical and histochemical studies of the seed development of *Euterpe oleracea* (Arecaceae). *Rodriguesia*, 2021.

FILIPPI, K.; GEORGAKA, N.; ALEXANDRI, M.; PAPAPOSTOULOU, H.; KOUTINAS, A. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Industrial Crops and Products*, v. 168, 2021.

FU, J.; WANG, Z.; MIAO, H.; et al. Rapid adaptive evolution of *Bacillus coagulans* to undetoxified corncob hydrolysates for lactic acid production and new insights into its high phenolic degradation. *Bioresource Technology*, 2023.

GIURCO, D. Ensure Sustainable Consumption and Production Patterns. *Mining, Materials, and the Sustainable Development Goals (SDGs)*, 2020.

GOMES, V. M. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR COM ÁCIDO SULFÚRICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 1, n. 1, p. iii–vii, 2018.

GOV. Biocombustíveis- Etanol. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2023/secao-4/secao-4.pdf>>. .

GRANDVIEWRESEARCH. Tamanho do mercado de ácidos dos EUA, relatório de análise de participação e tendências por tipo (orgânico, inorgânico) e previsões do segmento, 2021 – 2028. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/us-acids-market-report>>. Acesso em: 24/10/2023.

GRANDVIEWRESEARCH. Food Grade Alcohol Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Ethanol, Polyols), By Application (Healthcare), By Source, By Function, By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/food-grade-alcohol-market>>. Acesso em: 25/10/2023.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2010.

GUERREIRO, L. H. H.; BAIA, A. C. F.; ASSUNÇÃO, F. P. DA C.; et al. Investigation of the Adsorption Process of Biochar Açai (Euterpe oleracea Mart.) Seeds Produced by Pyrolysis. Energies, v. 15, n. 17, 2022.

GUETTLER, M. V.; RUMLER, D.; JAIN, M. K. Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine lumen. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999.

HOANG, T. D.; NGHIEM, N. Recent developments and current status of commercial production of fuel ethanol. Fermentation, 2021.

HU, X.; SHI, Y.; ZHANG, P.; et al. d-Mannose: Properties, Production, and Applications: An Overview. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016.

HUCK, W. Goal 7 Ensure access to affordable, reliable, sustainable and modern energy for all. Sustainable Development Goals, 2023.

IBGE. .Produção Agrícola municipal (PAM), 2017.

IDAM. .Relatório de Atividades 2020- RAIDAM, , n. 2020, p. 129 p., 2020.

IRAM, A.; CEKMECELIOGLU, D.; DEMIRCI, A. Screening of bacterial and fungal strains for cellulase and xylanase production using distillers' dried grains with solubles (DDGS) as the main feedstock. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021.

IRAM, A.; CEKMECELIOGLU, D.; DEMIRCI, A. Integrating 1G with 2G Bioethanol Production by Using Distillers' Dried Grains with Solubles (DDGS) as the Feedstock for Lignocellulolytic Enzyme Production. Fermentation, 2022.

JORGE, F. T. A. Viabilidade técnica e econômica de biorrefinaria de sementes de açai: Produção de manose. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

JR., N. P. Engenharia de Bioprocessos. , 2024. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions. 2008.

KAUR, A.; KUHAD, R. C. Valorization of Rice Straw for Ethanol Production and Lignin Recovery Using Combined Acid-Alkali Pre-treatment. Bioenergy Research, v. 12, n. 3, p. 570–582, 2019.

KHALAF, Z. A.; ABDUL-SAHEB, Y. S.; NAJIM, S. S. Determination of Micronutrients in Diabetic Women: a Serum Analysis of Seven Elements. *Periódico Tchê Química*, v. 20, n. 45, p. 38–48, 2023.

KUMAR, R.; STREZOV, V.; WELDEKIDAN, H.; et al. Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020.

DE LAS CASAS, C. A. El bioma amazónico y el Acuerdo de París: cooperación y gobernanza. *Revista de estudios brasileños*, v. 6, n. 11, p. 155, 2019.

LEIROS, H.-K. S.; KOZIELSKI-STUHRMANN, S.; KAPP, U.; et al. Structural Basis of 5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 2004.

LI, B.; QIU, Z.; HUANG, J.; et al. Application of Aromatic Ring Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts–Carboxylic Acids-Based Deep Eutectic Solvent for Enhanced Sugarcane Bagasse Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, and Cellulosic Ethanol Production. *Fermentation*, v. 9, n. 11, 2023.

LI, J.; ZHENG, X. Y.; FANG, X. J.; et al. A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 2011.

DE LIMA, A. C. P.; BASTOS, D. L. R.; CAMARENA, M. A.; et al. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021.

DE LIMA MESQUITA, A.; BARRERO, N. G.; FIORELLI, J.; et al. Eco-particleboard manufactured from chemically treated fibrous vascular tissue of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit: A new alternative for the particleboard industry with its potential application in civil construction and furniture. *Industrial Crops and Products*, v. 112, p. 644–651, 2018. Elsevier.

LINAN, L. Z.; CIDREIRA, A. C. M.; DA ROCHA, C. Q.; et al. Utilization of Acai Berry Residual Biomass for Extraction of Lignocellulosic Byproducts. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, v. 6, n. 4, p. 323–337, 2021. Elsevier.

LIRA, GILSO BLANCO; LOPES, ANNA SYLMARA DA COSTA; NASCIMENTO, FABIANA CRISTINA DE ARAÚJO; CONCEIÇÃO, GYSELLE DOS SANTOS; BRASIL, D. DO S. B. Processos de extração e usos industriais dos óleos de andiroba e açai\_ uma revisão.pdf. , 2021.

LIU, J.; WANG, C.; ZHAO, X.; et al. Bioethanol production from corn straw pretreated with deep eutectic solvents. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2023.

LIU, L.; ZHU, Y.; LI, J.; et al. Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012.

LIU, S. What is bioprocess engineering? *Bioprocess Engineering*. p.1–15, 2020.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; XU, J.; et al. Consolidated bioprocess for bioethanol production with

alkali-pretreated sugarcane bagasse. *Applied Energy*, 2015.

LO, E.; BRABO-CATALA, L.; DOGARIS, I.; AMMAR, E. M.; PHILIPPIDIS, G. P. Biochemical conversion of sweet sorghum bagasse to succinic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 129, n. 1, p. 104–109, 2020.

LUTZ, A. Óleos E Gorduras. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos, p. 589–625, 2008.

MADEIRA, A. P.; BENEDITTO, D.; DOUTOR, S. S.; ZOOLOGIA, E. Brazilian Journal of Development. *Brazilian Journal of Development*, , n. 7, p. 73015–73024, 2021.

MAIA, M. N. DOS S.; RAMOS, G. D. M.; RAMOS, G. D. M.; ANTUNES, V. DE C.; ANTUNES, V. DE C. Uso de coprodutos agroindustriais na fabricação de biscoitos / Use of agroindustrial by-products in biscuit manufacturing. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 1738–1747, 2022.

MANCINI, E.; DICKSON, R.; FABBRI, S.; et al. Economic and environmental analysis of bio-succinic acid production: From established processes to a new continuous fermentation approach with in-situ electrolytic extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 179, p. 401–414, 2022.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, 2012.

MARES, E. K. L.; GONÇALVES, M. A.; DA LUZ, P. T. S.; et al. Acai seed ash as a novel basic heterogeneous catalyst for biodiesel synthesis: Optimization of the biodiesel production process. *Fuel*, 2021.

MARIA, I.; SOUZA, E. F. DE; GONZALO, R.; et al. Improvement in Ethylene Glycol Bioconversion to Glycolic Acid by *Gluconobacter oxydans* Using Central Composite Experimental Design and Bioreactor Fed-Batch Strategies. , 2024.

MATTE, W. D.; SILVA, H. M. DA; ZEFERINO, C. P. Subprodutos da mandioca como alimento alternativo para frangos de corte. *Pubvet*, v. 15, n. 8, p. 1–11, 2021.

MAZALEUSKAYA, L. L.; THEKEN, K. N.; GONG, L.; et al. PharmGKB summary: Ibuprofen pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2015.

MORAES, F. A. W. S. U. DE A. L. I. *Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos*. 2019.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para Análise lignocelulósica. *Uma ética para quantos?*, , n. 2, p. 21–25, 2010.

NARISSETTY, V.; COX, R.; BOMMAREDDY, R.; et al. Valorisation of xylose to renewable fuels and chemicals, an essential step in augmenting the commercial viability of lignocellulosic biorefineries. *Sustainable Energy and Fuels*, 2022.

NAZARI, M. T.; MAZUTTI, J.; BASSO, L. G.; COLLA, L. M.; BRANDLI, L. Biofuels and

their connections with the sustainable development goals: a bibliometric and systematic review. *Environment, Development and Sustainability*, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger 7ª Edição*. 2019.

NEVES, L. T. B. C.; CAMPOS, D. C. DOS S.; MENDES, J. K. S.; URNHANI, C. O.; DE ARAÚJO, K. G. M. Quality of fruits manually processed of Açaí (*Euterpe oleracea* MART.) and BACABA (*Oenocarpus bacaba* MART.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2015.

NIETO, G.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; et al. Valorization of citrus co-products: Recovery of bioactive compounds and application in meat and meat products. *Plants*, 2021.

OLIVEIRA, A. C. DE; AGUILAR-GALVEZ, A.; CAMPOS, D.; ROGEZ, H. Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons onto depolymerized lignocellulosic wastes by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 3, n. 1, p. 131–143, 2019. No longer published by Elsevier.

OLIVEIRA, A. R.; RIBEIRO, A. E. C.; OLIVEIRA, É. R.; et al. Structural and physicochemical properties of freeze-dried açai pulp (*Euterpe oleracea* mart.). *Food Science and Technology (Brazil)*, 2020.

OLIVEIRA, M. A. M. L. DE; SILVA, C. F. DE O.; FRAGA, E. G.; SOUSA, L. A. Logística Reversa De Celulares Na Região Do Alto Tietê Um Estudo De Caso Na Cidade De Arujá-Sp. , p. 12–28, 2021.

OLIVEIRA, S. D.; ANTUNES, A. M. S.; PEREIRA JÚNIOR, N. TECHNOLOGY MAPPING OF PROCESSES FOR SUCCINIC ACID PRODUCTION FROM RENEWABLE SOURCES: AN ANALYSIS IN BRAZILIAN CONTEXT. *Revista Gestão, Inovação e Tecnologias*, 2014. PEREIRA, E.; FERREIRA, M. C.; SAMPAIO, K. A.; et al. Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. *Food Chemistry*, v. 278, p. 208–215, 2019. Elsevier.

PEREIRA, L. M. S.; MILAN, T. M.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biomass and Bioenergy*, 2021.

PEREIRA, N. J.; BON, E. P. DA S.; FERRARA, M. A. *Tecnologia de Bioprocessos*. 2008. PEREZ, C. L.; PEREIRA, L. P. R. D. C.; MILESSI, T. S.; et al. Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae*: Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. *Renewable Energy*, 2022.

PERIYASAMY, S.; BEULA ISABEL, J.; KAVITHA, S.; et al. Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review. *Chemical Engineering Journal*, 2023.

PESSÔA, T. S.; LIMA FERREIRA, L. E. DE; DA SILVA, M. P.; et al. Açai waste benefiting by gasification process and its employment in the treatment of synthetic and raw textile wastewater. *Journal of Cleaner Production*, v. 240, 2019.

RAZAGHPOUR, MOJGAN; MALEK, REZA MOHAMMAD; MONTAZER, MAJID;

MALLAKPOUR, S. Amino-functionalized cross-linked cellulosic fabric with antibacterial, UV protection, and coloring effects using folic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 637–649, 2022.

ROCHA, J. H. A.; DE SIQUEIRA, A. A.; DE OLIVEIRA, M. A. B.; et al. Circular Bioeconomy in the Amazon Rainforest: Evaluation of Açai Seed Ash as a Regional Solution for Partial Cement Replacement. *Sustainability (Switzerland)*, 2022.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Experimental design and process optimization*. 2014.

SAHOO, D.; UMMALYMA, S. B.; OKRAM, A. K.; et al. Effect of dilute acid pretreatment of wild rice grass (*Zizania latifolia*) from Loktak Lake for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 253, p. 252–255, 2018.

SANDHU, K. S.; SHIV, A.; KAUR, G.; et al. Integrated Approach in Genomic Selection to Accelerate Genetic Gain in Sugarcane. *Plants*, 2022.

SANTOS; TAILANE VIEIRA, C.; MIRELA, L.; LAÍS TELES DA SILVA E, S.; MODESTO ANTÔNIO, C. ESTUDOS PRÉVIOS PARA O ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS USANDO AÇAÍ, WHEY PROTEIN E CARRAGENA. *CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO: DO CAMPO À MESA*. p.586–603, 2020. Instituto Internacional Despertando Vocações.

SATO, M. K.; DE LIMA, H. V.; COSTA, A. N.; et al. Biochar from Acai agroindustry waste: Study of pyrolysis conditions. *Waste Management*, v. 96, p. 158–167, 2019. Pergamon.

SHELTON, H. M. *The Science and Fine Art of Fasting (The Hygienic System, Vol.III: Orthotrophy)*. 1963.

SHENG, T.; MA, Z. W.; SUN, S. G. Insights into the Pt/Rh(1 1 1) interface for direct ethanol fuel cells. *Applied Surface Science*, 2020.

SHUKOR, H.; ABDESHAHIAN, P.; AL-SHORGANI, N. K. N.; et al. Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol. *Bioresource Technology*, 2016.

DA SILVA, D. L.; DE ARAÚJO, M. E. L.; LAMEIRA, C. N. *CONTROLE DE QUALIDADE DO VINHO DE AÇAÍ, COMERCIALIZADO NOS MUNICÍPIOS DE BELÉM*. , 2021.

DA SILVA, E. P.; SIQUEIRA, H. H.; DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E. V. DE B. Effect of adding flours from marolo fruit (*Annona crassiflora* Mart) and jervá fruit (*Syagrus romanzoffiana* Cham Glassm) on the physicals and sensory characteristics of food bars. *Food Science and Technology (Brazil)*, v. 36, n. 1, p. 140–144, 2016.

SINGH, S.; ADAK, A.; SARITHA, M.; et al. Bioethanol production scenario in India: Potential and policy perspective. *Sustainable Biofuels Development in India*, 2017.

SIQUEIRA, A. D.; BRONDIZIO, E. S. Local food preference and global markets. Perspectives on açai fruit as terroir and a Geographic Indicator product. *Appetite*, v. 56, n. 2, p. 544, 2011. Academic Press.

SOARES, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; et al. Cell Immobilization Using Alginate-Based Beads as a Protective Technique against Stressful Conditions of Hydrolysates for 2G Ethanol Production. *Polymers*, 2022.

SOUSA, R. S. DE; NOVAIS, T. S.; BATISTA, F. O.; ZUÑIGA, A. D. G. Análise sensorial de cookie desenvolvidos com farinha da casca de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Research, Society and Development*, v. 9, n. 4, p. e45942816, 2020.

SOUZA, W. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, 2007.

SUGANTHI, S.; VIGNESH, S.; KALYANA SUNDAR, J.; RAJ, V. Fabrication of PVA polymer films with improved antibacterial activity by fine-tuning via organic acids for food packaging applications. *Applied Water Science*, 2020.

SWEBOCKI, T.; BARRAS, A.; ABDERRAHMANI, A.; HADDADI, K.; BOUKHERROUB, R. Deep Eutectic Solvents Comprising Organic Acids and Their Application in (Bio)Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023.

TAKKELLAPATI, S.; LI, T.; GONZALEZ, M. A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 20, n. 7, p. 1615–1630, 2018.

TAN, E. C. D.; LAMERS, P. Circular Bioeconomy Concepts—A Perspective. *Frontiers in Sustainability*, v. 2, 2021.

TAYLOR, M. J.; ALABDRABALAMEER, H. A.; SKOULOU, V. Choosing physical, physicochemical and chemical methods of pre-treating lignocellulosic wastes to repurpose into solid fuels. *Sustainability (Switzerland)*, 2019.

VERGARA, P.; WOJTUSIK, M.; REVILLA, E.; et al. Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 178–186, 2018.

VONG, K.; EDA, S.; KADOTA, Y.; et al. An artificial metalloenzyme biosensor can detect ethylene gas in fruits and *Arabidopsis* leaves. *Nature Communications*, 2019.

WALLACE, T. C.; BAILEY, R. L.; BLUMBERG, J. B.; et al. Fruits, vegetables, and health: A comprehensive narrative, umbrella review of the science and recommendations for enhanced public policy to improve intake. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020.

WANG, C.; SU, X.; SUN, W.; et al. Efficient production of succinic acid from herbal extraction residue hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 265, p. 443–449, 2018.

WANG, J.; ZENG, A. PING; YUAN, W. Succinic acid fermentation from agricultural wastes: The producing microorganisms and their engineering strategies. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 2022.

WANG, P.; ZHENG, Y.; LI, Y.; et al. Recent advances in biotransformation, extraction and green production of D-mannose. *Current Research in Food Science*, v. 5, p. 49–56, 2022.

Elsevier.

WIKENE, K. O.; BRUZELL, E.; TØNNESEN, H. H. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015.

WISCHRAL, D.; ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F.; DE FRANÇA PASSOS, D.; PEREIRA, N. Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by *Lactobacillus pentosus*: Integrating xylose and glucose fermentation. *Biotechnology Progress*, 2019.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; BALAN, V.; HOLTZAPPLE, M. T. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals 34 SBE Update: Biofuels Meet the Authors The Need for Biofuels Producing Biofuels via the Thermochemical Platform Producing Biofuels via the Sugar Platfor. , , n. June, p. 33–65, 2013.

XU, C.; ALAM, M. A.; ZHANG, J.; et al. Identification of lignocellulosic derivatives inhibiting succinic acid fermentation and molecular mechanism investigation. *Industrial Crops and Products*, 2022.

XU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; et al. Long chain alcohol and succinic acid co-production process based on full utilization of lignocellulosic materials. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2018.

YANG, Q.; WU, M.; DAI, Z.; et al. Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*: a promising native succinic acid producer. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2020.

ZADEH, Z. E.; ABDULKHANI, A.; ABOELAZAYEM, O.; SAHA, B. Recent insights into lignocellulosic biomass pyrolysis: A critical review on pretreatment, characterization, and products upgrading. *Processes*, 2020.

ZAVARIZE, D. G. Insights on preparation and characteristics of KOH-doped carbons derived from an abundant agroindustrial waste in Brazil: Amazon açai berry seeds. *Bioresource Technology Reports*, 2021.

ZHANG, T.; PAN, Z.; QIAN, C.; CHEN, X. Isolation and purification of d-mannose from palm kernel. *Carbohydrate Research*, v. 344, n. 13, p. 1687–1689, 2009. Elsevier.

ZITHA, E. Z. M.; MAGALHÃES, D. S.; DO LAGO, R. C.; et al. Changes in the bioactive compounds and antioxidant activity in red-fleshed dragon fruit during its development. *Scientia Horticulturae*, 2022.