

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

BRENDHA GARSTKA

**AVALIAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS ORIUNDOS DA  
PRODUÇÃO E BENEFICIAMENTO DE SOJA VISANDO À  
OBTENÇÃO DE BIOETANOL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO  
2019

BRENDHA GARSTKA

**AVALIAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS ORIUNDOS DA  
PRODUÇÃO E BENEFICIAMENTO DE SOJA VISANDO À  
OBTENÇÃO DE BIOETANOL**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Vaz de Arruda

TOLEDO  
2019

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **Trabalho de Conclusão de Curso**

#### **AVALIAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS ORIUNDOS DA PRODUÇÃO E BENEFICIAMENTO DE SOJA VISANDO À OBTENÇÃO DE BIOETANOL**

por

**BRENDHA GARSTKA**

Monografia apresentada às 15 horas 00 min. do dia 28 de junho de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de TECNÓLOGO EM PROCESSOS QUÍMICOS, Curso de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

**Dra. Danielle Camargo**

UTFPR Câmpus Toledo

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva**

UTFPR Câmpus Toledo

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Vaz de Arruda**

UTFPR Câmpus Toledo

Orientadora

**Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara**

Coordenador do TCC

O "Termo de Aprovação" encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, UTFPR Câmpus Toledo -PR, conforme Normativa Conjuntiva 01/11 da PROGRAD/PROPPG.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que destina o seu amor à ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar forças para superar todas as dificuldades encontradas ao longo do trabalho.

Agradeço aos meus pais, Merieli Coelho e Sergio Garstka, por confiarem na minha capacidade, me apoiarem e proporcionarem condições para minha educação.

Aos meus amigos e familiares, por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço COAMO por disponibilizar os resíduos para a pesquisa.

Agradeço ao Professor Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela doação do micro-organismo empregado no presente trabalho.

A minha orientadora Priscila Vaz de Arruda, por todos os ensinamentos e tempo dedicado a me auxiliar na realização deste presente trabalho.

Agradeço a esta faculdade e todo seu corpo docente, além dos técnicos presentes nos laboratórios, que me proporcionaram as condições necessárias para concluir este curso.

E enfim, a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, o meu muito obrigado!

*“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.”*

*Stephen Hawking*

## RESUMO

GARSTKA, Brendha. Avaliação de Materiais Lignocelulósicos Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja Visando à Obtenção de Bioetanol. 66 f. TCC (Curso de Tecnologia em Processos Químicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2019.

Em busca da redução das emissões gasosas poluentes e da dependência mundial por combustíveis fósseis, o trabalho teve como objetivo a obtenção de etanol oriundo da produção e beneficiamento de soja, material abundante no estado do Paraná, em especial na região oeste. No entanto, para o aproveitamento destes materiais como fonte de carbono, foi necessária sua desconstrução. Neste sentido, realizou-se um planejamento estatístico tipo DCC com diferentes condições de pré-tratamento ácido diluído (1%, 3% e 5% (m/v)), temperatura (111°C, 116°C e 121°C) e tempo de reação (20 min, 30 min e 40 min), a fim de se obter a melhor condição de hidrolisado hemicelulósico, rico em açúcares fermentescíveis. O hidrolisado obtido de acordo com o planejamento foi concentrado e submetido à fermentação com a levedura *Spathaspora passalidarum* para obtenção de etanol. Experimento controle (constituído por meio sintético), empregando-se xilose comercial também foi avaliado, a fim de comparação. Conforme o planejamento estatístico, a condição que apresentou melhor resultado foi à 121°C, 20 min, com uma concentração de ácido a 5% (m/v), a qual resultou em 16,07 g/L de xilose. Verificou-se que o emprego do hidrolisado como meio de fermentação proporcionou valor de 5,62 g/L de etanol, o qual foi 60,68% inferior à concentração deste composto no experimento controle. Com relação aos parâmetros fermentativos, encontrou-se valores de conversão de substrato em produto de 0,183 g/g e 0,392 g/g e produtividade volumétrica de 0,234 g/L.h e 0,596 g/L.h para os meios constituídos por hidrolisado e de controle, respectivamente. Como este trabalho tem caráter inovador, bem como ainda são valores iniciais, verifica-se que os resultados são promissores, principalmente quanto ao emprego destes materiais para obtenção de meios de cultivo, bioetanol ou outros produtos com valor agregado.

**Palavras-chave:** *Spathaspora passalidarum*. Xilose. Bioetanol. Resíduos da soja.

## ABSTRACT

GARSTKA, Brendha. Evaluation of lignocellulosic materials from soybeans harvesting and processing for bioethanol production 66 f. TCC Technology Chemical Processes Course- Federal University of Technology - Paraná. Toledo, 2019.

In order to reduce emissions of greenhouse gases and the world phosphorus industry, the objective of this study was use ethanol from the production and processing of soybeans, an abundant material in the state of Paraná, especially in the western region. However, for the use of the materials as carbon source, it was necessary the deconstruct of them. In this sense it was evaluated a DCC type statistical design of dilute acid pretreatment with different H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid concentration (1%, 3% and 5% (m/v)), temperature (111°C, 116°C and 121°C) and reaction time (20 min, 30 min and 40 min), in order to obtain a better condition of hemicellulosic hydrolyzate, rich in fermentable sugars. The hydrolyzate obtained according to the program was submitted a fermentation with a *Spathaspora passalidarum* for ethanol production. A control experiment (constituted with synthetic medium), using commercial xylose was also evaluated to compare the results. According to the statistical design, the condition that provided the best result was 121°C, 20 min, with a concentration of 5% (m/v) of acid. In this condition, 16.07 g/L of xylose was reached. It was verified that the use of the hydrolyzate as fermentation medium provided 5.62 g/L ethanol, which was 60.68% lower than the production of it in synthetic medium. Regarding to the fermentation parameters, values of 0.183 g/g and 0.234 g/L.h were also found for the hydrolyzate medium and 0.392 g/g and 0.596 g/L.h for the control medium. As this work has an innovative character, as well as initial results, it is verified that these are promising, mainly as to the use of these materials to obtain cultivation media for bioproducts production, such as bioethanol or other value-added products.

**Keywords:** *Spathaspora passalidarum*. Xylose. Bioethanol. Residues of soybeans.





## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ART	Açúcar redutor total
[ ]	Concentração
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µL	Microlitro
β	Beta
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DCC	Delineamento composto central
g	Gramas
GEE	Gases do efeito estufa
h	Hora
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta performance
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
nm	Nanômetro
min	Minuto
mL	Mililitros
L	Litro
P.A	Pureza analítica
pH	Potencial hidrogênioônico
rpm	Rotação por minuto
YP	Yeast peptone – Meio de peptona de levedura
YEPD	Yeast extract peptone dextrose – Meio extrato de levedura, peptona e glicose.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Planejamento experimental empregado para obtenção de hidrolisado hemicelulósico de materiais oriundos da produção e beneficiamento de soja .....	30
Tabela 2- Valores reais para as variáveis do planejamento experimental do hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja .....	31
Tabela 3- Condições do planejamento experimental para diferentes trabalhos .....	31
Tabela 4- Composição do meio de cultura para crescimento do pré-inóculo e inóculo .....	33
Tabela 5- Composição do meio de fermentação do meio sintético .....	34
Tabela 6- Caracterização química parcial dos resíduos oriundo da produção e do beneficiamento de soja .....	40
Tabela 7- Resultados da concentração de carboidratos após hidrólise ácida.....	42
Tabela 8 – Concentrações de fenóis presentes nas amostras após hidrólise ácida dos resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja.....	45
Tabela 9- Avaliação da destoxificação do hidrolisado .....	48
Tabela 10- Perdas de volume do hidrolisado durante as etapas .....	48
Tabela 11- Parâmetros fermentativos para o meio hidrolisado .....	51
Tabela 12- Parâmetros fermentativos para o meio sintético .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da molécula de Etanol .....	18
Figura 2- Estrutura dos materiais lignocelulósicos .....	19
Figura 3- Estrutura primária da celulose .....	20
Figura 4- Estrutura dos álcoois precursores da lignina .....	21
Figura 5- Valor bruto da produção rural 2017 da cidade de Toledo .....	22
Figura 6- Efeito do pH sobre o material lignocelulósico .....	24
Figura 7- Esquema das reações que ocorrem durante pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos.....	25
Figura 8- Metabolismo dos principais açúcares constituintes da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos objetivando à obtenção de etanol por leveduras.....	26
Figura 9- Etapas realizadas no presente trabalho.....	28
Figura 10- Gráfico de Pareto para Xilose .....	43
Figura 11- Superfície de resposta da concentração de xilose a partir da hidrólise ácida do resíduo da soja.....	44
Figura 12- Gráfico de Pareto para Compostos Fenólicos .....	46
Figura 13- Hidrolisados obtidos em função das diferentes etapas dos procedimentos de destoxificação .....	47
Figura 14- Avaliação do consumo de xilose (A), do crescimento de células (B) e produção de etanol (C) para o meio sintético  e o meio hidrolisado  .....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1	Biocombustível .....	17
3.1.1	Bioetanol.....	17
3.2	Material Lignocelulósico.....	19
3.2.1	Celulose.....	19
3.2.2	Hemicelulose .....	20
3.2.3	Lignina .....	20
3.2.4	Extrativos e Cinzas .....	21
3.3	Materiais Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja para a Obtenção Biotecnológica de Etanol .....	22
3.4	Pré-tratamento para Obtenção de Açúcares Fermentescíveis .....	23
3.4.1	Formação de Inibidores .....	24
3.5	Fermentação.....	26
3.5.1	Micro-organismos capazes de metabolizar pentoses .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	Origem do Material .....	28
4.2	Caracterização Química .....	29
4.2.1	Determinação dos Teores de lignina insolúvel e cinzas da lignina .....	29
4.3	Obtenção e Preparo dos Materiais Lignocelulósicos Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja.....	29
4.3.1	Pré-Tratamento com Ácido Diluído .....	29
4.4	Tratamento do Hidrolisado.....	32
4.5	Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico.....	32
4.5.1	Micro-organismo .....	32
4.5.2	Preparo do Pré-inóculo e inóculo.....	33
4.5.3	Meio e Condições de Fermentação .....	34

4.6	Métodos analíticos .....	35
4.6.1	Concentração celular .....	35
4.6.2	Determinação nas concentrações de açúcares e etanol .....	35
4.6.3	Determinação de Lignina Insolúvel .....	35
4.6.4	Determinação do Teor de Cinzas da Lignina .....	36
4.6.5	Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	36
4.6.6	Determinação da Concentração de Fenóis.....	36
4.6.7	Determinação do pH.....	37
4.6.8	Determinação de extrativos .....	37
4.6.9	Determinação do teor de umidade.....	37
4.7	Forma de Análise dos Resultados .....	38
4.7.1	Análise estatística .....	38
4.7.2	Determinação da remoção de açúcares .....	38
4.7.3	Determinação dos parâmetros fermentativos .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>40</b>
5.1	Caracterização Química .....	40
5.2	Estudo das Condições do Pré-tratamento Ácido Diluído .....	41
5.3	Concentração e Tratamento do Hidrolisado .....	47
5.4	Fermentação do Hidrolisado Proveniente dos Materiais Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja .....	49
5.4.1	Avaliação do consumo do substrato, produção de etanol e crescimento celular durante cultivo em hidrolisado e meio sintético (experimento controle).....	49
5.4.2	Avaliação dos parâmetros fermentativos .....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente busca por soluções para reduzir a dependência mundial por combustíveis fósseis e a diminuição das emissões gasosas poluentes, põe em evidência as pesquisas para obtenção de etanol oriundo de biomassas vegetais. Neste contexto, há um crescente interesse pelo aproveitamento de fontes renováveis de energia, como é o caso dos resíduos da soja disponíveis em grande quantidade. Segundo Matos (2005), a soja gera 2.700 toneladas de biomassa para cada 1.000 toneladas de grãos colhidos.

A cultura da soja é um dos principais ramos da economia brasileira, responsável pela geração de emprego e aumento do Índice de Desenvolvimento Humano nas regiões produtoras. No Paraná, a soja apresenta forte vocação ao agronegócio, sendo que a região oeste, desse estado, também se destaca na sua produção (EMBRAPA, 2018; FRANCHINI *et al.*, 2016).

Os resíduos da soja são bons exemplos de materiais lignocelulósicos, uma vez que, somente a casca, já contém valores significativos de celulose e hemicelulose, que são frações constituídas principalmente por açúcares fermentescíveis (MIRION *et al.*, 2001).

O etanol, então, como produto oriundo do aproveitamento de biomassas vegetais, é uma possibilidade de se agregar valor à cadeia produtiva, uma vez que gera uma combustão mais limpa ao final do processo em comparação aos combustíveis fósseis (SILVA, 2014).

No entanto, um dos maiores desafios para o aproveitamento dessas biomassas é a desconstrução da matriz polimérica, uma vez que para a utilização das frações celulósica e hemicelulósica presentes, é necessário a solubilização dos seus açúcares constituintes. Em consequência dessa dificuldade, há muitos estudos para produção de bioetanol através do processo fermentativo, buscando a melhor condição da obtenção destes açúcares (LARSSON, 2000; LALUCE *et al.*, 2012; GONÇALVES, 2009; SILVA, 2018).

Dentro deste contexto, este trabalho buscou estabelecer correlações entre as variáveis envolvidas nas operações de processamento dos diferentes resíduos da produção e beneficiamento de soja, visando à obtenção de etanol por meio do aproveitamento da fração hemicelulósica destes materiais. Ademais, procurou-se a

realização de cooperação técnico-científico entre a academia e o setor agroindustrial de Toledo e região, em especial com a cooperativa COAMO - Agroindustrial Cooperativa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de etanol a partir da fração hemicelulósica dos materiais oriundos da produção e do beneficiamento de soja, pelo micro-organismo *Spathaspora passalidarum*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química dos materiais oriundos da produção e do beneficiamento de soja, quanto aos teores de umidade, extrativos, cinzas e lignina insolúvel;
- Avaliar as diferentes condições de pré-tratamento dos materiais oriundos da produção e do beneficiamento de soja, quanto ao teor de açúcares fermentescíveis, bem como de compostos tóxicos, visando à melhor condição da obtenção de hidrolisado hemicelulósico;
- Destoxificar o hidrolisado hemicelulósico dos resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja;
- Avaliar a produção de etanol por processo fermentativo a partir da melhor condição do pré-tratamento para obtenção do hidrolisado hemicelulósico e comparar os resultados obtidos em relação ao meio sintético, constituído por xilose comercial (condição de controle).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biocombustível

Os biocombustíveis são combustíveis líquidos ou gasosos que são produzidos através da biomassa vegetal, portanto, é um combustível baseado em plantas. A vantagem de não conter enxofre, um dos responsáveis pela chuva ácida, não contribuem para o aumento de dióxido de carbono na atmosfera, responsável pelo efeito estufa (DOMÍNGUEZ, 2003). Aliada a uma maior sustentabilidade, verifica-se que o uso de etanol propicia reduções significativas nas emissões estimadas de GEE (gases do efeito estufa) por unidade de energia produzida (PEDRO, 2013).

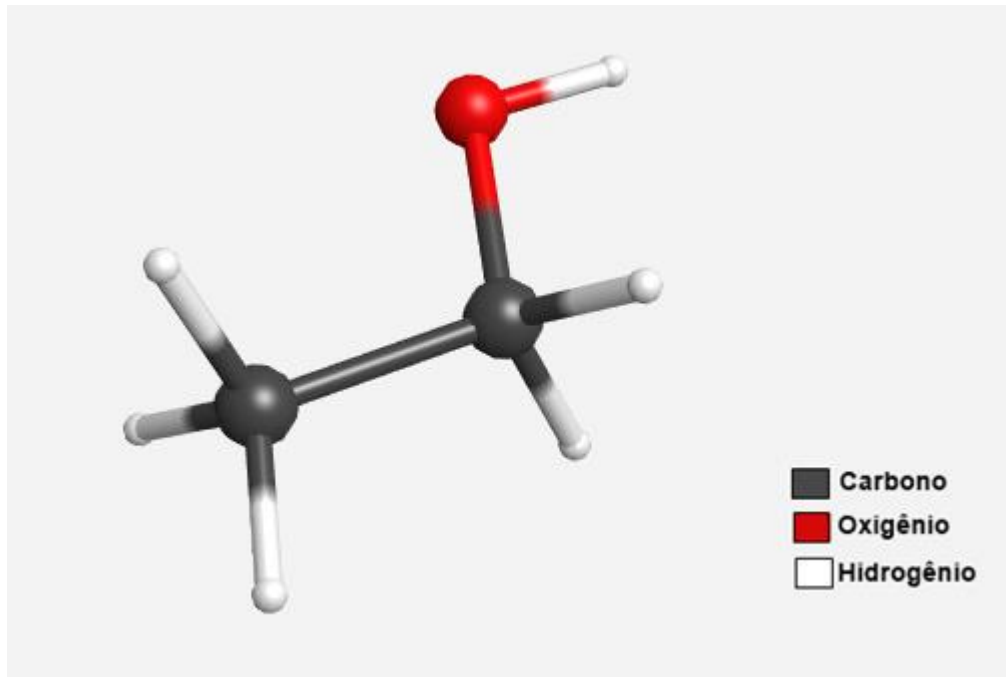
Segundo Barbosa (2011), os biocombustíveis provenientes de fontes renováveis podem ser classificados em biocombustíveis de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matérias de uso alimentar, ou seja, ricos em óleos ou açúcares simples. Já os biocombustíveis de segunda geração são provenientes de matérias-primas, como a palha, resíduos de madeira, resíduos agrícolas e serragem. Os biocombustíveis de terceira e quarta geração são produzidos a partir de novas fontes de biomassa, usando processos de engenharia genética moderna e de nanotecnologia.

Os biocombustíveis de segunda geração têm a vantagem de não competir diretamente com a produção alimentar, portanto, a utilização de materiais lignocelulósicos pode resultar na maior produção de biocombustível (PEDRO, 2013).

##### 3.1.1 Bioetanol

O etanol gerado a partir da biomassa vegetal pode ser denominado de bioetanol, é uma substância incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água. Pode ser produzido por qualquer biomassa vegetal que apresente valores elevados de amido, açúcares ou teores de celulose e hemicelulose (SILVA, 2009; BARBOSA, 2011). A Figura 1 apresenta a estrutura da molécula do etanol.

**Figura 1-** Estrutura da molécula de Etanol



Fonte: Autoria própria (2019).

O bioetanol, obtido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos, vem se destacando nas pesquisas, uma vez que esta tecnologia tem sido relevante para atender o mercado como uma alternativa às fontes energéticas (SILVA, 2010; CAMARGO, 2016; COSTA, 2016; WANG *et al.*, 2017; SILVA, 2018; SANTOS, 2018).

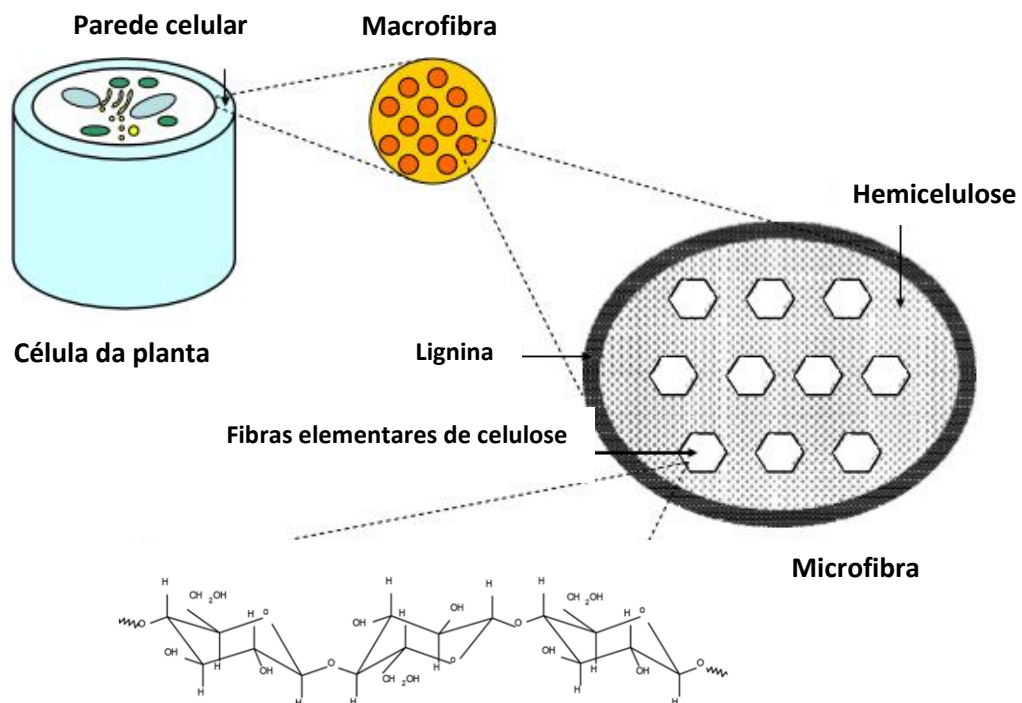
Segundo Domínguez (2003), é necessário considerar a biomassa e os resíduos orgânicos como recursos complementares de fontes energéticas, uma vez que o uso de materiais lignocelulósicos é, em médio prazo, a opção mais promissora para a obtenção de etanol combustível. Entre as principais fontes de biomassa vegetal, encontram-se: sabugo de milho, madeira, resíduos agrícolas, resíduos florestais, bagaço de cana e malte, palha de cana, trigo, soja e arroz, casca de soja e arroz, farelo de trigo e subprodutos agrícolas (MACHADO *et al.*, 2006).

No caso da soja, sua produção e beneficiamento podem gerar palha, vagem e casca, os quais são materiais que contêm valores significativos de carboidratos e podem ser hidrolisados e convertidos em bioetanol a partir da ação de micro-organismos.

### 3.2 Material Lignocelulósico

Os materiais lignocelulósicos são biomassas de origem vegetal, constituídos na maior parte por polissacarídeos, como a celulose e a hemicelulose, e por lignina (componentes estruturais), mas também apresentam outros componentes, minoritários, como é o caso das cinzas e extrativos (Figura 2) (BARBOSA, 2011).

**Figura 2-** Estrutura dos materiais lignocelulósicos

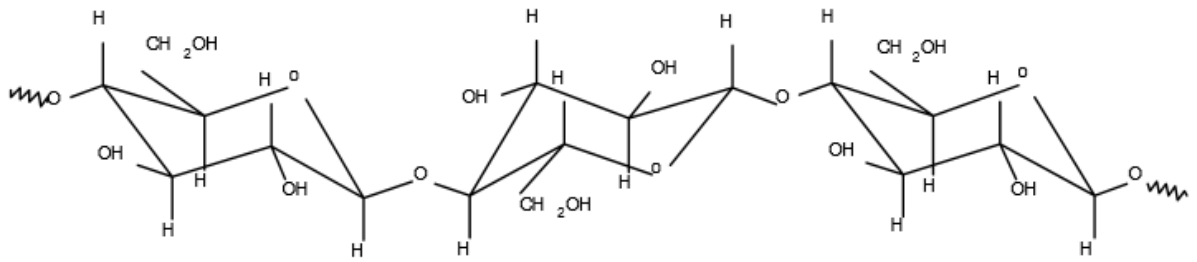


Fonte: Adaptado de ZHANG, (2008).

#### 3.2.1 Celulose

A celulose é um dos principais componentes das paredes celulares e é constituído por moléculas de glicose que são ligadas por ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , como mostrado na Figura 3 (DOMÍNGUEZ, 2003).

**Figura 3-** Estrutura primária da celulose



Fonte: DOMÍNGUEZ (2003).

A molécula de celulose assume a forma de fita achatada, com os grupos de hidroxila (-OH) livres, podendo formar pontes de hidrogênio, umas com as outras (DOMÍNGUEZ, 2003).

### 3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são compostas, principalmente, por pentoses (D-xilose e L-arabinose), e em menor quantidade as hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), e os ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico e ácido metil galacturônico) (SARKAR *et al.*, 2012).

A hemicelulose é de degradação mais facilitada do que a celulose e está presente ligada à celulose e a lignina, funcionando como uma fase de adesão na estrutura (SILVA, 2009).

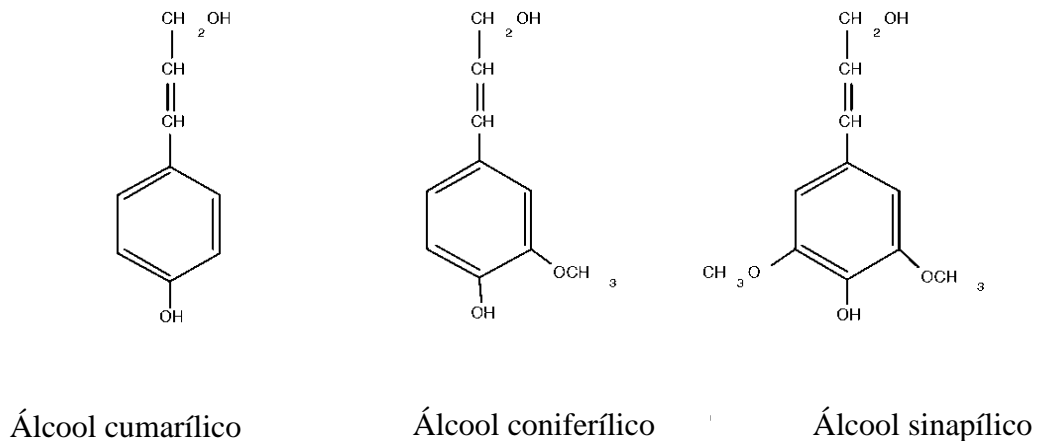
### 3.2.3 Lignina

A lignina é a terceira fração majoritária que compõe a parede celular da biomassa lignocelulósica (DOMÍNGUEZ, 2003).

São constituídas pela polimerização oxidativa de três álcoois precursores (Figura 4): álcool trans-coniferílico, álcool trans-p-cumarílico e álcool trans-sinapílico (HATTI, 2004).

A lignina é a matriz mais resistente da parede celular da planta, portanto, quanto maior o teor de lignina, maior a resistência à degradação química (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

**Figura 4-** Estrutura dos álcoois precursores da lignina



Fonte: DOMÍNGUEZ (2003).

### 3.2.4 Extrativos e Cinzas

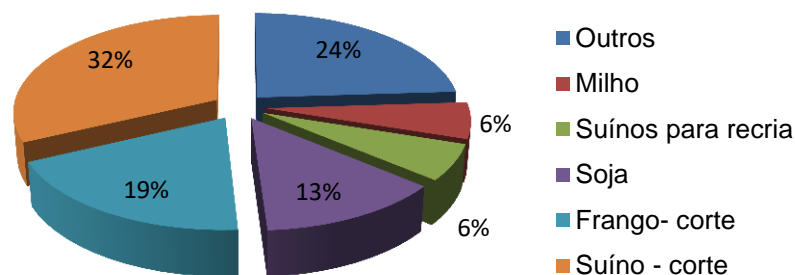
A parede celular também é formada por outras substâncias (lipídios, ceras, etc) que possuem diferentes composições, que são chamadas de extrativos (ROJAS, 2012).

E as cinzas são resíduos inorgânicos que permanecem após secar a biomassa em altas temperaturas, como o cálcio, potássio, manganês, entre outros (DOMÍNGUEZ, 2003; BOLZAN, 2013).

### 3.3 Materiais Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja para a Obtenção Biotecnológica de Etanol

Cerca de 85% da colheita mundial de soja é processada para produzir óleo, somente 10% são usados diretamente para alimentação humana e os 5% restantes, são usados como sementes ou para alimentação dos animais (BUZZATTI; PORTELA, 2016). A região oeste do Paraná destaca-se pela atividade pecuária, seguida da agricultura e florestal. Por sua vez, a cidade de Toledo é grande produtora de frango e suínos de raça para corte e para recria. A referida cidade também se destaca pela produção de soja e milho, como pode ser observado na Figura 5 (EISFELD; NASCIMENTO, 2015; DERAL, 2018).

**Figura 5-** Valor bruto da produção rural 2017 da cidade de Toledo



Fonte: Adaptado de DERAL (2018).

Com relação à lavoura de soja, esta tem sido protagonista quanto ao aumento da área de produção de grãos no país, sendo um crescimento de 1,9%, na safra de 2018/2019, comparada a safra anterior, o que corresponde a 35.822 mil hectares (CONAB, 2019).

Para a produtividade da soja no Brasil, saltou de 2.823 kg/ha na safra de 2006/2007 para 3.206 na safra 2018/2019, representando um aumento de 13,6% em 12 anos (CONAB, 2019).

Durante a produção e beneficiamento de soja, são gerados diferentes materiais lignocelulósicos como: a palha (caule, folhas), vagem e casca. A palha não

faz parte do processo, sendo gerada na produção da soja e durante a colheita, é separada e deixada no campo para servir de proteção ao solo, raramente é aproveitada (EMBRAPA, 2007). Já a vagem é um resíduo obtido durante a seleção e extração do óleo vegetal da soja e é aproveitada como fonte proteica na fabricação de rações, para a criação de frangos e suínos (MARTINS, 2015; FRANCHINI *et al.*, 2016). Quanto às cascas, estas são removidas dos grãos, para produzir um farelo com alto teor de proteína (MASIERO, 20\_\_), os quais também são destinados à ração animal.

### 3.4 Pré-tratamento para Obtenção de Açúcares Fermentescíveis

O pré-tratamento tem como objetivo tornar os açúcares disponíveis para as etapas subsequentes (hidrólise e fermentação) durante a produção de etanol, através da desconstrução da parede celular, e da redução da celulose, hemicelulose e matriz de lignina (PIENKOS; ZHANG, 2009).

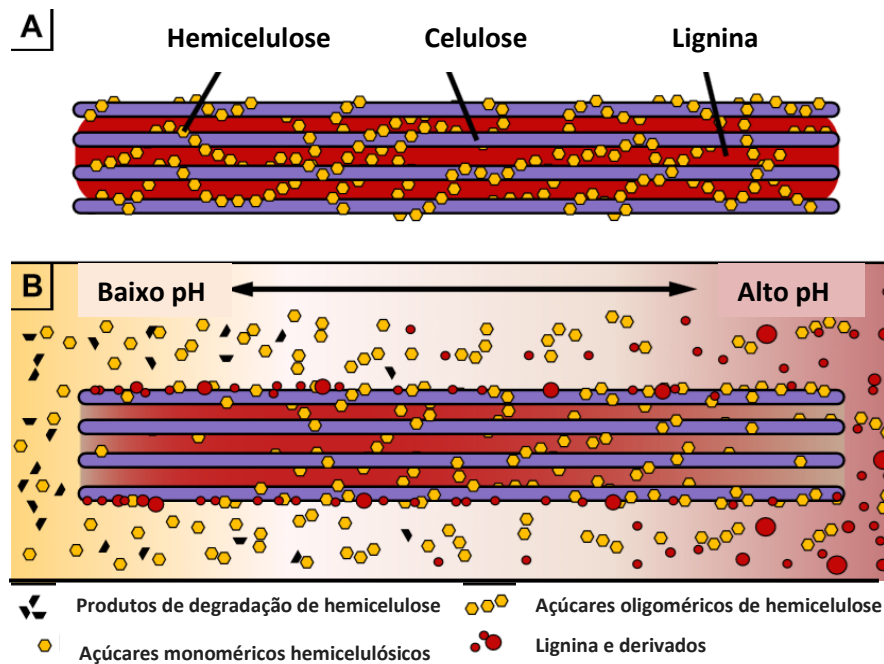
Além disso, o pré-tratamento deve satisfazer outras características, como baixo consumo de energia, bem como investimentos e utilização de reagentes baratos (DOMÍNGUEZ, 2003).

Os principais métodos utilizados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos são classificados como físicos, químicos, biológicos e combinados (ROJAS, 2012).

Os pré-tratamentos químicos, incluem pré-tratamentos ácidos ou alcalinos. No caso de pré-tratamentos catalisados por ácidos (geralmente ácido sulfúrico) a fração da hemicelulose é hidrolisada em açúcares (xilose, arabinose e outros), enquanto que nos pré-tratamentos catalisados por bases (geralmente hidróxido de sódio), parte da lignina é removida (OGEDA; PETRI, 2010). A Figura 6, ilustra esse comportamento do pH, no pré-tratamento, sobre o material lignocelulósico.

De acordo com Gonçalves (2009), a concentração do ácido, juntamente com a temperatura e o tempo de exposição do material lignocelulósico, influenciam a quantidade de açúcar disponibilizado no hidrolisado, sendo que a degradação desses carboidratos podem gerar a formação de compostos inibidores do processo fermentativo.

**Figura 6-** Efeito do pH sobre o material lignocelulósico



Fonte: Baseado em GARLOCK *et al.*, (2011).

### 3.4.1 Formação de Inibidores

Durante o pré-tratamento ou hidrólise da biomassa lignocelulósica são produzidos subprodutos que podem resultar em efeitos inibidores aos microorganismos produtores de etanol, sendo os mais conhecidos: Furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos. Esses compostos têm efeitos como a extensão da fase *lag* da levedura, prejudicam o crescimento, bem como a produção de etanol (LARSSON, 2000; ZAUTSEN, 2011).

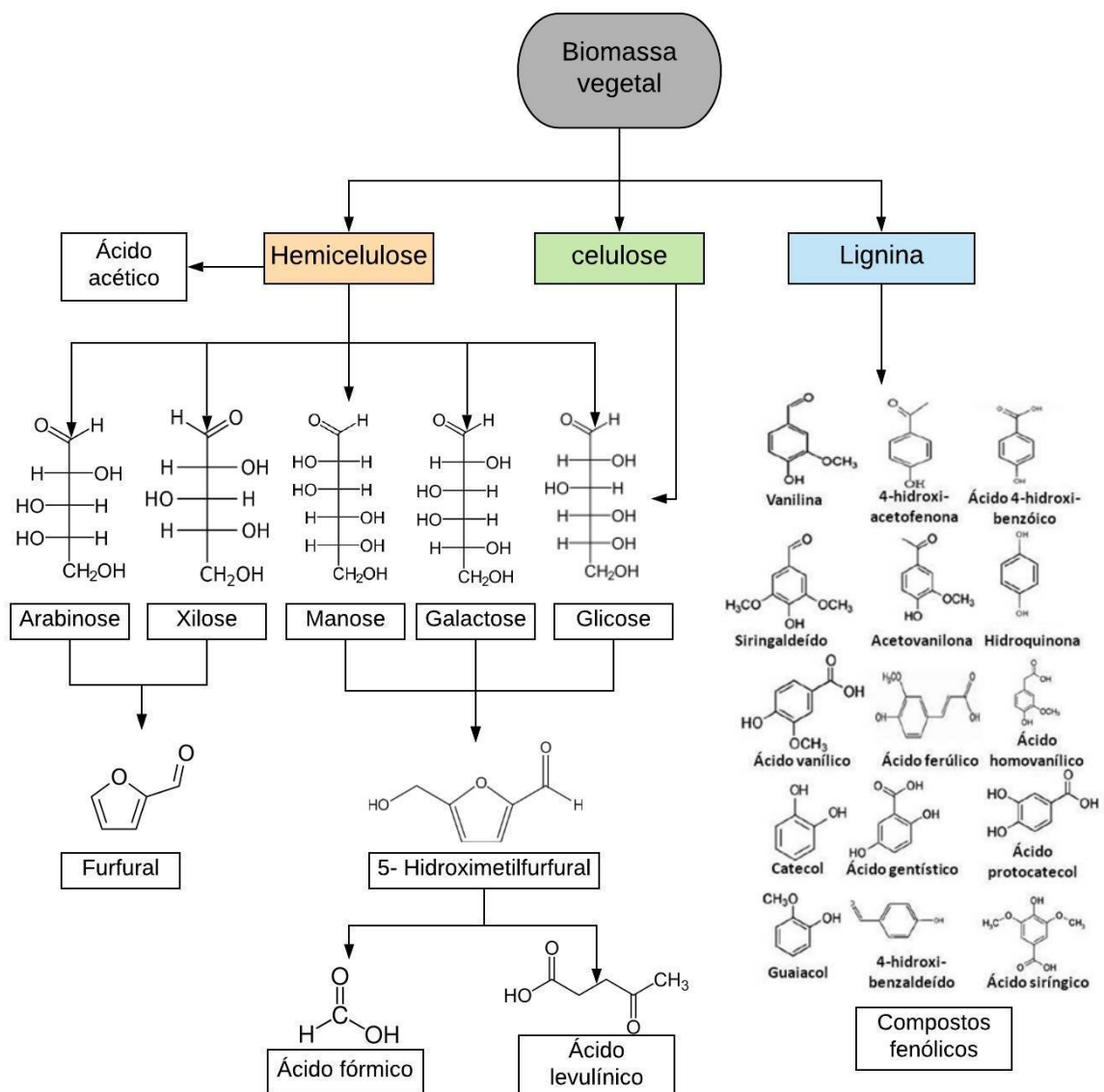
O Furfural é gerado pela degradação das pentoses (xilose e arabinose), principais produtos da hidrólise de hemiceluloses, já o 5-HMF é gerado pela degradação de glicose, produto da hidrólise de celulose, ou de outras hexoses (galactose e manose) e produtos da hidrólise de hemicelulose (ZAUTSEN, 2011). Também ocorre formação de ácido acético, oriundo da degradação da hemicelulose, que interfere na taxa de crescimento e na conversão de substrato xilose em etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2014).



Segundo Domínguez (2003), durante o pré-tratamento, uma parte da lignina também se degrada formando compostos fenólicos.

A Figura 7 apresenta um esquema simplificado das reações que podem acontecer durante procedimento de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Verifica-se nesta Figura, que além da liberação de açúcares, há a formação de compostos tóxicos à levedura (fenólicos, ácidos, etc.), conforme já foi mencionado anteriormente (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

**Figura 7-** Esquema das reações que ocorrem durante pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos

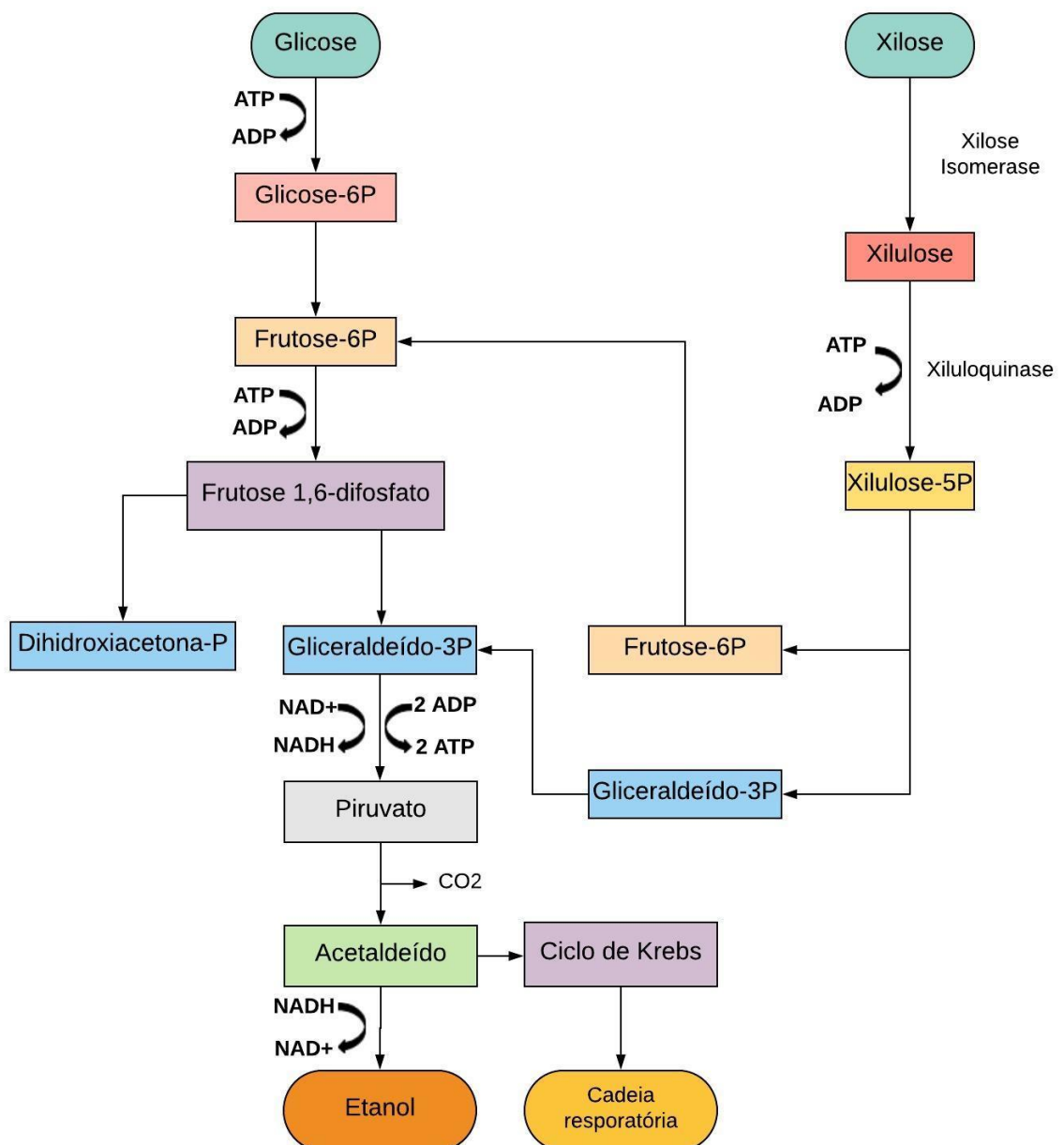


Fonte: Baseado em PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; FONSECA, 2009).

### 3.5 Fermentação

A Figura 8 apresenta um esquema proposto para a utilização dos principais açúcares encontrados em hidrolisados hemicelulósicos obtidos de materiais lignocelulósicos e a formação de etanol por leveduras.

**Figura 8-** Metabolismo dos principais açúcares constituintes da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos objetivando à obtenção de etanol por leveduras



Fonte: Baseado em ARRUDA (2011).

Como pode ser observado na Figura 8, o primeiro passo para a conversão de xilose à etanol é a sua isomerização até xilulose, que é feita pela enzima xilose isomerase. Uma vez formada a molécula de xilulose, esta é convertida pela enzima xiluloquinase e fosforilada, resultando em xilulose-5-fosfato (LALUCE *et al.*, 2012; MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

A xilulose-5-fosfato pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via das fosfopentoses, a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Estes compostos intermediários podem ser metabolizados pela via Glicolítica e formar piruvato, o qual pode ser oxidado pelo ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (ciclo de Krebs), recuperando as coenzimas ou ser fermentado à etanol, com a liberação de dióxido de carbono, formando acetaldeído (SILVA, 2007).

### 3.5.1 Micro-organismos capazes de metabolizar pentoses

Os micro-organismos capazes de fermentar pentoses são algumas espécies de leveduras, como do gênero *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen* e de bactérias como *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Thermoanaerobacter* e *Erwinia*, entre outros (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2005).

Dentre as linhagens, encontra-se, também, a *Spathaspora passalidarum*, naturalmente consumidora de xilose e recentemente isolada do ecossistema brasileiro. É uma dos poucos micro-organismos que conseguem fermentar e metabolizar eficientemente a xilose, portanto, essa espécie gera interesse para a pesquisa na produção de biocombustível a partir de material vegetal (COSTA, 2016; UNIPROT, 2019).

De acordo com Costa (2006), a *Spathaspora passalidarum* proporciona elevada produtividade volumétrica quando comparado ao *S. stipitis*, uma vez que apresentou velocidade de crescimento superior à esta levedura, quando cultivada em meio contendo hidrolisado, tendo ainda, um período da fase *lag* inferior à mesma, evidenciando o potencial deste micro-organismo para produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico.

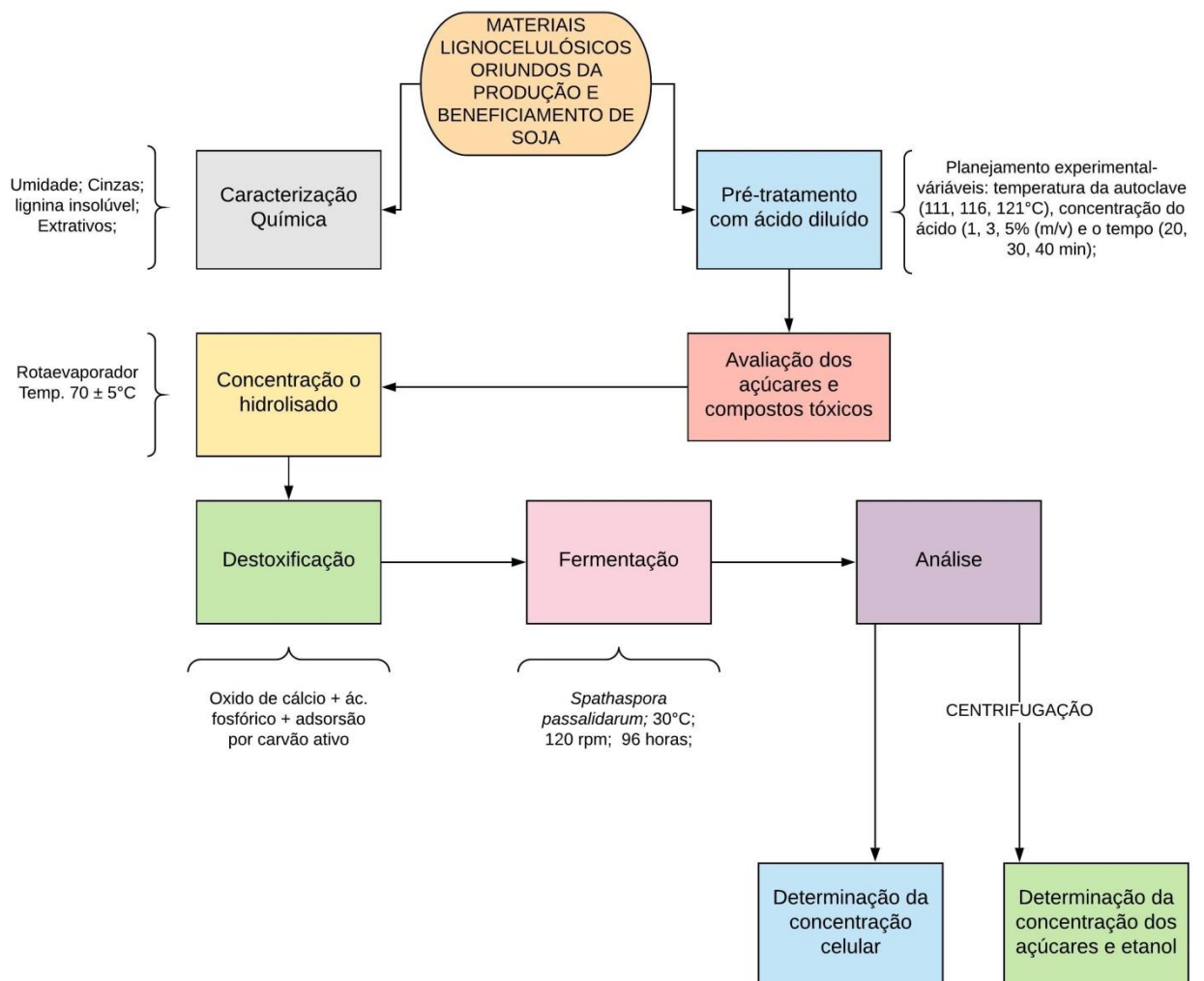
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Origem do Material

Os resíduos palha, casca e vagem, provindas respectivamente da produção e beneficiamento de soja, estudadas neste trabalho, foram fornecidas pela COAMO Agroindustrial Cooperativa - Toledo- PR.

A seguir é apresentado um fluxograma (Figura 9) das etapas referentes à realização do presente trabalho.

**Figura 9-** Etapas realizadas no presente trabalho



Fonte: Autoria própria (2019).

## 4.2 Caracterização Química

Os materiais lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja resíduos da soja “*in natura*” foram submetidos à moagem e secos até um peso constante. Posteriormente, foram pré-tratados e caracterizados em relação aos teores de lignina insolúvel, cinzas, umidade e extrativos.

### 4.2.1 Determinação dos Teores de lignina insolúvel e cinzas da lignina

Os materiais lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja foram submetidos à moagem a uma granulometria de 14 mesh e posteriormente secos em estufa até peso constante. As amostras foram preparadas a partir de 2 g do material seco com adição de 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (v/v), com agitação constante por 7 min à 45°C. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 275 mL de água destilada. Essa suspensão foi levada para a autoclave nas seguintes condições: temperatura de 121 °C, tempo de reação de 30 minutos, conforme metodologia proposta por Gouveia *et al.*, (2009). Após este procedimento, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e posteriormente, a fração sólida foi separada da fração líquida por meio de filtração em papel de filtro qualitativo. Após a hidrólise, o material retido no papel filtro foi caracterizado em relação lignina insolúvel e cinzas da lignina (GOUVEIA *et al.*, 2009).

## 4.3 Obtenção e Preparo dos Materiais Lignocelulósicos Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja

### 4.3.1 Pré-Tratamento com Ácido Diluído

As biomassas (palha, casca e vagem) foram submetidas a um pré-tratamento com ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído, com uma relação sólido-líquido 1:10, em autoclave de acordo com um planejamento experimental DCC (delineamento composto central), proposto abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1-** Planejamento experimental empregado para obtenção de hidrolisado hemicelulósico de materiais oriundos da produção e beneficiamento de soja

Ensaio	Temperatura	Tempo	Concentração ácida
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Fonte: Baseado em CAMARGO (2016).

As condições foram determinadas por um planejamento experimental DCC  $2^3$  com quatro repetições no ponto central, que visou estudar os efeitos causados pela temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico. Os pré-tratados obtidos foram filtrados e caracterizados, sendo que a condição que apresentou melhor resultado quanto ao teor de açúcares fermentescíveis foi escolhido para a fermentação e posterior obtenção de bioetanol.

A matriz do planejamento DCC  $2^3$  com quatro repetições no ponto central é apresentada na Tabela 1, sendo o ponto central (0), menor nível (-1), maior nível (+1). Os fatores utilizados na codificação estão demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2-** Valores reais para as variáveis do planejamento experimental do hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja

Fatores	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Temperatura (°C)	111	116	121
Tempo (min)	20	30	40
Concentração Ácida (%) (m/v)	1,0	3,0	5,0

Fonte: Autoria própria (2018).

As condições para os valores apresentados no planejamento experimental foram baseados em trabalhos previamente realizados para outras matérias primas lignocelulósicas, de acordo com a Tabela 3.

**Tabela 3-** Condições do planejamento experimental para diferentes trabalhos

Biomassa	Temperatura (°C)	Concentração ácida (%)	Tempo (min)	Referência
<b>Resíduos da soja</b>	<b>111; 116; 121;</b>	<b>1,0; 3,0; 5,0;</b>	<b>20; 30; 40;</b>	<b>Presente trabalho</b>
Palha de cevada	120; 130; 140;	0,50; 0,75; 1,0;	20; 30; 40;	MORAES (2008)
Bagaço de sorgo	111; 115; 121;	0,75; 1,25; 1,75;	40; 50; 60;	CAMARGO (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	100; 120; 140;	0,5; 2,5; 4,0;	15,0; 67,5; 120,0;	RUEDA (2010)
Palha e Sabugo de milho	100; 110; 120;	0,5; 2,0; 3,5;	15,0; 67,5; 120,0;	SANTOS (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	121;	7,0; 9,0;	15; 30; 45; 60;	MORAIS; BROETTO (2012)

Fonte: Autoria própria (2018).

Após a escolha da condição de pré-tratamento do material lignocelulósico que apresentou características desejáveis, como alta concentração de açúcares fermentescíveis, bem como baixo teor de tóxicos.

O mesmo antes de ser empregado na etapa de fermentação, foi repetido, a fim de se obter um maior volume, e, posteriormente, concentrado a vácuo, a um fator de concentração correspondente a 3 vezes ao seu teor inicial de açúcares com

a finalidade de aumentar a concentração inicial de xilose. A metodologia consistiu da utilização de um rotaevaporador, empregando-se temperatura de  $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$  (ARRUDA, 2011).

#### 4.4 Tratamento do Hidrolisado

No processo de hidrólise ácida há a formação de compostos tóxicos ao micro-organismo, portanto foi necessária a realização de procedimento de destoxificação. Este foi baseado na metodologia descrita por Marton *et al.*, (2006) modificado por Camargo (2016). O procedimento consistiu em adicionar ao hidrolisado óxido de cálcio até pH 7,0 e centrifugá-lo à 4000 rpm por 20 min. Posteriormente, o pH do mesmo foi reduzido até 2,5 com a adição de ácido fosfórico P.A e centrifugado a 4000 rpm por 20 min. Após essas etapas, o hidrolisado foi submetido à adsorção com 2,5% (m/v) de carvão ativo e levado a incubadora de movimento rotatório a 200 rpm,  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Posteriormente, o hidrolisado foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min e filtrado com papel qualitativo para a remoção do precipitado.

O hidrolisado foi analisado quanto à quantidade de compostos fenólicos presente após o tratamento de destoxificação, de acordo com o item 4.6.6.

#### 4.5 Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico

##### 4.5.1 Micro-organismo

A levedura *Spathaspora passalidarum* (Y-27907), foi fornecida pelo Professor Carlos Augusto Rosa, da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

A cultura foi mantida e repicada em tubos de ensaio contendo meio YEPD (*Yeast extract peptone dextrose* - Meio extrato de levedura, peptona e glicose) inclinado e conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  (ATCC, 2018).



#### 4.5.2 Preparo do Pré-inóculo e inóculo

O pré-inóculo e inóculo foram preparados de acordo Costa (2016). Para isso, preparou-se meio rico YP (*Yeast peptone* – Meio extrato de levedura 1%, peptona 2% e ágar 1,5%), adicionando de 3% (m/v) de xilose, conforme ilustra a Tabela 4, sendo que as soluções estoques foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 15 minutos, com exceção a xilose, que foi autoclavada a 111°C por 15 minutos. Após a esterilização, as soluções foram misturadas para a obtenção das concentrações almejadas para os cultivos.

**Tabela 4-** Composição do meio de cultura para crescimento do pré-inóculo e inóculo

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	30,0
Peptona	20,0
Extrato de levedura	10,0

Fonte: Baseado em COSTA (2016).

Após o preparo de 100 mL meio, a levedura foi transferida, a partir de uma alçada de repique previamente preparado, para os frascos contendo o meio descrito na Tabela 4. Os frascos foram incubados em *shaker* à 30°C, sob agitação de 120 rpm, por 24 horas, constituindo então um pré-inóculo (COSTA, 2016). Após este período, o pré-inóculo foi transferido para um volume de 900 mL, totalizando 1L de inóculo. Este foi cultivado nas mesmas condições por mais 24h e posteriormente, as leveduras foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 min, lavadas com água destilada esterilizada e sofreram uma nova centrifugação para o descarte do sobrenadante. As células foram concentradas e adicionou-se pequena quantidade de água esterilizada, a qual foi empregada como inóculo. A concentração inicial de células nas fermentações foi em torno de 1,0 g/L de acordo com a curva de calibração (absorbância por peso seco) (COSTA, 2016).

#### 4.5.3 Meio e Condições de Fermentação

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido conforme descrito no item 4.3.1 e somente após sua obtenção em maior volume, concentração em torno de 50 g/L de açúcares fermentescíveis e destoxificação, este foi submetido à fermentação.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) em duplicata, com 50 mL do meio de fermentação, realizado tanto para o meio contendo hidrolisado enriquecido com o meio YP (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona), quanto para o meio sintético (experimento controle), este acrescido de xilose comercial, conforme ilustra a Tabela 5.

**Tabela 5-** Composição do meio de fermentação do meio sintético

Componente	Concentração (g/L)
Xilose PA	50,0
Peptona	20,0
Extrato de levedura	10,0

Fonte: Baseado em COSTA (2016).

Para a fermentação a partir do hidrolisado hemicelulósico dos resíduos oriundos da produção e beneficiamento de soja como meio na produção de etanol por *S. passalidarum*, empregou-se as condições de 30°C, 120 rpm, com o pH ajustado para 6,2 com a solução de NaOH 3N (COSTA, 2016). Quanto ao meio sintético, este também foi submetido à fermentação nas mesmas condições do meio contendo o hidrolisado.

As fermentações ocorreram por 96 horas e as amostras, correspondentes ao volume de cada Erlenmeyer (50 mL), foram retiradas no início de cada fermentação e após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Estas foram imediatamente avaliadas quanto à concentração celular. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min e utilizadas para a determinação da concentração dos açúcares e etanol.

## 4.6 Métodos analíticos

### 4.6.1 Concentração celular

O crescimento celular do meio foi determinado por espectrofotometria a 600 nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por meio de uma curva padrão que correlaciona a absorbância e o peso seco das células obtidas do cultivo (ARRUDA, 2011).

### 4.6.2 Determinação nas concentrações de açúcares e etanol

As concentrações dos açúcares (D-xilose, D-glicose e L-arabinose) e de etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), realizadas conforme metodologias estabelecidas pelo Laboratório Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no *Câmpus* de Pato Branco.

### 4.6.3 Determinação de Lignina Insolúvel

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o material retido no papel filtro a partir da hidrólise do resíduo lavado com 1500 mL de água destilada e transferido para um recipiente, onde foi submetido à secagem em estufa a 100°C até a massa constante (GOUVEIA *et al.*, 2009).

A lignina insolúvel foi calculada pela seguinte Equação (2).

$$\% L_{Ki} = \left( \frac{M_k - M_c}{M_a} \right) * 100 \quad (2)$$

Onde:  $L_{Ki}$  – Lignina Klason insolúvel;

$M_k$  – massa de lignina insolúvel seca;

$M_c$  – massa de cinzas;

$M_a$  – massa da amostra seca.

#### 4.6.4 Determinação do Teor de Cinzas da Lignina

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido o mesmo papel filtro foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado e levado até a mufla a 300°C, onde foi calcinada lentamente e mais 2h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado a temperatura ambiente e a massa de cinzas determinada. A massa foi utilizada para subtrair do teor de lignina no item 4.6.3 para obter a massa da lignina insolúvel (GOUVEIA *et al.*, 2009).

#### 4.6.5 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Para o teor de cinzas totais dos resíduos, iniciou-se pesando 1,0g da amostra e colocou-se em um cadinho previamente tarado e seco. O cadinho com a amostra foi submetido à mufla a 800°C por 2h. A determinação das cinzas totais se deu pela diferença de massa antes e após o procedimento, (GOUVEIA *et al.*, 2009), pela Equação (3).

$$\% \text{cinzas} = \left( \frac{M_c}{M_a} \right) * 100 \quad (3)$$

Onde: % cinzas – percentual em massa de cinzas;

$M_c$ – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);  $M_a$ – massa da amostra base seca.

#### 4.6.6 Determinação da Concentração de Fenóis

Para a determinação de compostos fenólicos foi utilizado à metodologia de Folin Ciocalteu, onde, foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu, a 2,2 mL de amostra do hidrolisado, seguido da adição de 0,8 mL de solução de carbonato de sódio saturado, posteriormente foi agitado os tubos em vórtex. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e após esse período determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro a 760 nm. O branco foi utilizado água destilada, no lugar da amostra e procedendo com os mesmos passos.

A curva padrão foi realizada com ácido gálico (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELARAVENTOS, 1999).

#### 4.6.7 Determinação do pH

Os pH's das amostras foram determinados por pHmetro, utilizando correção de temperatura.

#### 4.6.8 Determinação de extrativos

O procedimento "*Determination of Extractives in Biomass*" (SLUITER et al., 2008) do NREL, foi utilizado para quantificar os extrativos na biomassa. Para isso, foi pesado 4g da amostra em base seca e adicionado em envelopes de papel filtro, sendo extraídos pelo aparelho Soxhlet com éter de petróleo. Posteriormente, ocorreu a evaporação do solvente em estufa a 105°C até obtenção de massa constante. Para determinar o teor de extrativos, foi utilizada a Equação (4):

$$\% \text{extrativos} = \left( \frac{M_a - M_b}{M_a} \right) * 100 \quad (4)$$

Onde:  $M_a$ – massa do bagaço em base seca (g);  $M_b$ – massa do bagaço livre de extrativos (g).

#### 4.6.9 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado através da termobalaça determinadora de umidade por infravermelho, modelo i-Thermo 163M da Bel Engineering.

## 4.7 Forma de Análise dos Resultados

### 4.7.1 Análise estatística

Os resultados do DCC, à análise estatística, foi realizada utilizando-se software denominado “Statistica”, versão 13.3.

### 4.7.2 Determinação da remoção de açúcares

A remoção, em porcentagem, dos açúcares foi calculada pela relação entre os valores iniciais e finais destes.

### 4.7.3 Determinação dos parâmetros fermentativos

- **Fator de Conversão de D-xilose em etanol ( $Y_{P/S}$ )**

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de etanol produzido por massa de xilose consumida, em gramas, expresso pela Equação (6).

$$Y_{P/S} = \left( \frac{\Delta P}{\Delta S} \right) = \left( \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \right) \quad (6)$$

Onde:  $P_i$  e  $P_f$  – Concentração inicial e final de etanol;  $S_i$  e  $S_f$  – Concentração inicial e final de substrato (xilose).

- **Fator de Conversão de D-xilose em células ( $Y_{X/S}$ )**

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de substrato consumida para formação de células, em gramas, expresso pela Equação (7).

$$Y_{X/S} = \left( \frac{\Delta X}{\Delta S} \right) = \left( \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \right) \quad (7)$$

Onde:  $S_i$  e  $S_f$  – Concentração inicial e final de substrato;  $X_i$  e  $X_f$  – Concentração inicial e final das células.

- **Produtividade Volumétrica de etanol ( $Q_P$ )**

A produtividade volumétrica de etanol expressa a concentração de etanol produzido (g/L) por tempo (h), expresso pela Equação (8).

$$Q_P = \left( \frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \left( \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \right) \quad (8)$$

Onde:  $P_i$  e  $P_f$  – Concentração inicial e final de etanol;  $t_i$  e  $t_f$  – Tempo inicial e tempo final de fermentação.

- **Rendimento ( $\% \eta$ )**

Este parâmetro representa o rendimento da fermentação, sendo comparado com o valor obtido teoricamente, sendo calculado pela Equação (9).

$$\% \eta = \left( \frac{Y_{\left(\frac{P}{S}\right)}}{Y_{\left(\frac{P}{S}\right) \text{teórico}}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Sendo que o  $Y_{(P/S) \text{ teórico}}$  é  $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ , segundo Garcia (2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização Química

Os resíduos da produção e beneficiamento de soja (palha, vagem, casca), foram analisados quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos e lignina. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 6.

**Tabela 6-** Caracterização química parcial dos resíduos oriundo da produção e do beneficiamento de soja

Biomassa	Umidade	Cinzas	Extrativos	Lignina Insolúvel	Referência
<b>Resíduos da soja</b>	<b>11,90%</b>	<b>5,75%</b>	<b>3,41%</b>	<b>19,39%</b>	<b>Presente trabalho</b>
Palha de cevada	11,40%	7,00%	10,50%	12,54%	BARBOSA (2011)
Palha de cana	-	2,40%	5,90%	-	SILVA (2009)
Palha de arroz	-	8,70%	3,30%	15,50%	CARNEIRO (2011)
Poda de Oliveira	23,30%	3,40%	27,10%	17,60%	FONSECA (2014)
<i>Pinus oocarpa</i>	4,31%	1,26%	2,78%	25,18%	MORAES <i>et al.</i> (2005)
Bagaço de sorgo (CVSW 82568)	10,85%	3,64%	8,25%	-	CAMARGO (2016)
Casca de soja	-	4,00%	5,00%	4,80%	ROJAS (2012)

Fonte: Autoria própria (2019).

O teor de umidade obtida (11,9%) nos resíduos da soja apresentou um resultado semelhante ao reportado por Barbosa (2011) para a palha da cevada, porém inferior à biomassa de poda de oliveira (FONSECA, 2014) e superior a de *pinus oocarpa* (MORAES *et al.*, 2005) e bagaço de sorgo (CAMARGO, 2016).



Quanto aos extrativos do presente trabalho, totalizaram em 3,41%, apresentando um resultado semelhante ao reportado por Carneiro (2011) de 3,3%, referente à biomassa de poda de oliveira e próximo a Rojas (2012) de 5,0% referente a casca de soja. Portanto, os extrativos presentes no material estudado, provêm das cascas de soja. Enquanto que esse resultado foi superior ao *pinus oocarpa* (MORAES *et al.*, 2005) e inferior à palha de cevada (BARBOSA, 2011), palha de cana (SILVA, 2009), poda de oliveira (FONSECA, 2014) e bagaço de sorgo (CAMARGO, 2016).

Para a fração de cinzas, verificou-se um teor de 5,75%, enquanto para a fração de lignina insolúvel, esta apresentou um teor de 19,39%, verificando o alto valor desse componente, o que dificulta o acesso aos açúcares fermentescíveis. O teor de cinzas e lignina insolúvel está entre os valores apresentados pela literatura de 8,7% (CARNEIRO, 2011), 2,4% de cinzas (SILVA, 2009) e 12,54% (BARBOSA, 2011), 25,18% de lignina insolúvel (MORAES *et al.*, 2005) para os materiais de palha de arroz, palha de cana, palha de cevada, *Pinus oocarpa*, respectivamente.

De acordo com a Tabela 6, os resultados dos teores encontrados para os resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja são dependes do cultivo, processamento e genética da biomassa. Além disso, verifica-se que a biomassa avaliada, apresentou resultados dentro da faixa de variação reportada na literatura para outros materiais.

## 5.2 Estudo das Condições do Pré-tratamento Ácido Diluído

Na Tabela 7 são apresentados os resultados dos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental DCC 2<sup>3</sup>, variando a temperatura, concentração do ácido e tempo na autoclave para o pré-tratamento dos resíduos da produção e do beneficiamento de soja. Os açúcares xilose, glicose e arabinose, foram obtidos como resposta ao planejamento.

**Tabela 7-** Resultados da concentração de carboidratos após hidrólise ácida

Amostra	Temp. (°C)	Tempo (min)	[ ] ácido	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)
1	(-1) 111	(-1) 20	(-1) 1%	3,185	3,820	2,650
2	(+1) 121	(-1) 20	(-1) 1%	3,555	5,180	4,565
3	(-1) 111	(+1) 40	(-1) 1%	3,295	4,585	4,185
4	(+1) 121	(+1) 40	(-1) 1%	3,330	3,685	4,890
5	(-1) 111	(-1) 20	(+1) 5%	4,280	10,500	5,430
<b>6</b>	<b>(+1) 121</b>	<b>(-1) 20</b>	<b>(+1) 5%</b>	<b>5,590</b>	<b>16,065</b>	<b>5,840</b>
7	(-1) 111	(+1) 40	(+1) 5%	5,565	15,250	5,680
<b>8</b>	<b>(+1) 121</b>	<b>(+1) 40</b>	<b>(+1) 5%</b>	<b>6,485</b>	<b>16,960</b>	<b>6,235</b>
9	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	4,640	11,410	5,305
10	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	3,795	8,900	4,020
11	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	4,335	10,460	4,980
12	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	5,185	12,380	5,730

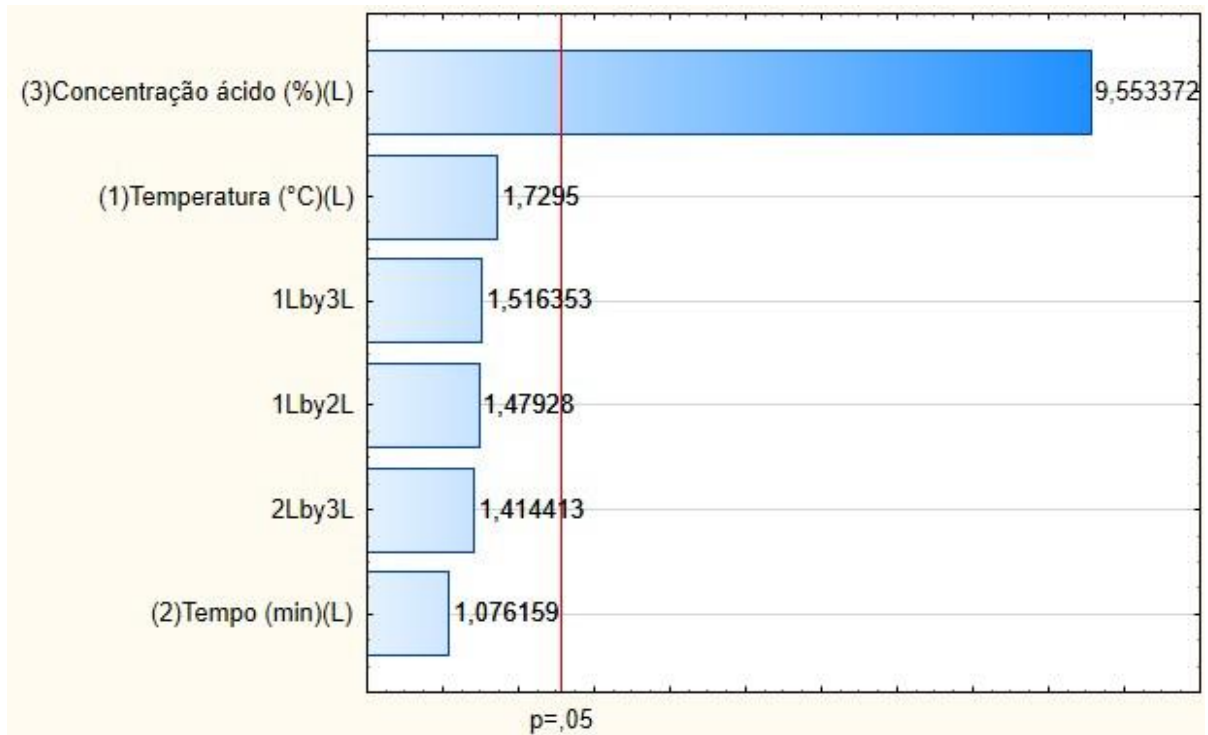
Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com a Tabela 7, observa-se que as amostras 6 e 8 apresentaram os melhores resultados com relação à concentração de xilose, principal fonte de carbono para o processo fermentativo em questão, contendo totais de 16,065 g/L e 16,960 g/L, respectivamente. Ambas as amostras ocorreram em condições de pré-tratamento idênticas à concentração de ácido empregada (5% m/v), bem como temperatura (121 °C), com exceção do tempo de reação.

Camargo (2016), também avaliou os parâmetros tempo, concentração de ácido e temperatura para o bagaço de sorgo, e verificou que a melhor condição para obtenção de xilose foi de 121°C, 40 min, com uma concentração de ácido de 1,75% (m/v), resultando em 14,22 g/L de xilose. O presente trabalho, obteve uma condição ( amostra 6) com a mesma temperatura (121°C), porém o tempo foi menor (20 min a menos), resultando em 11,48% a mais de xilose.

Para a verificação dos parâmetros significativos no experimento foi feito um gráfico de Pareto (Figura 10).

**Figura 10-** Gráfico de Pareto para Xilose



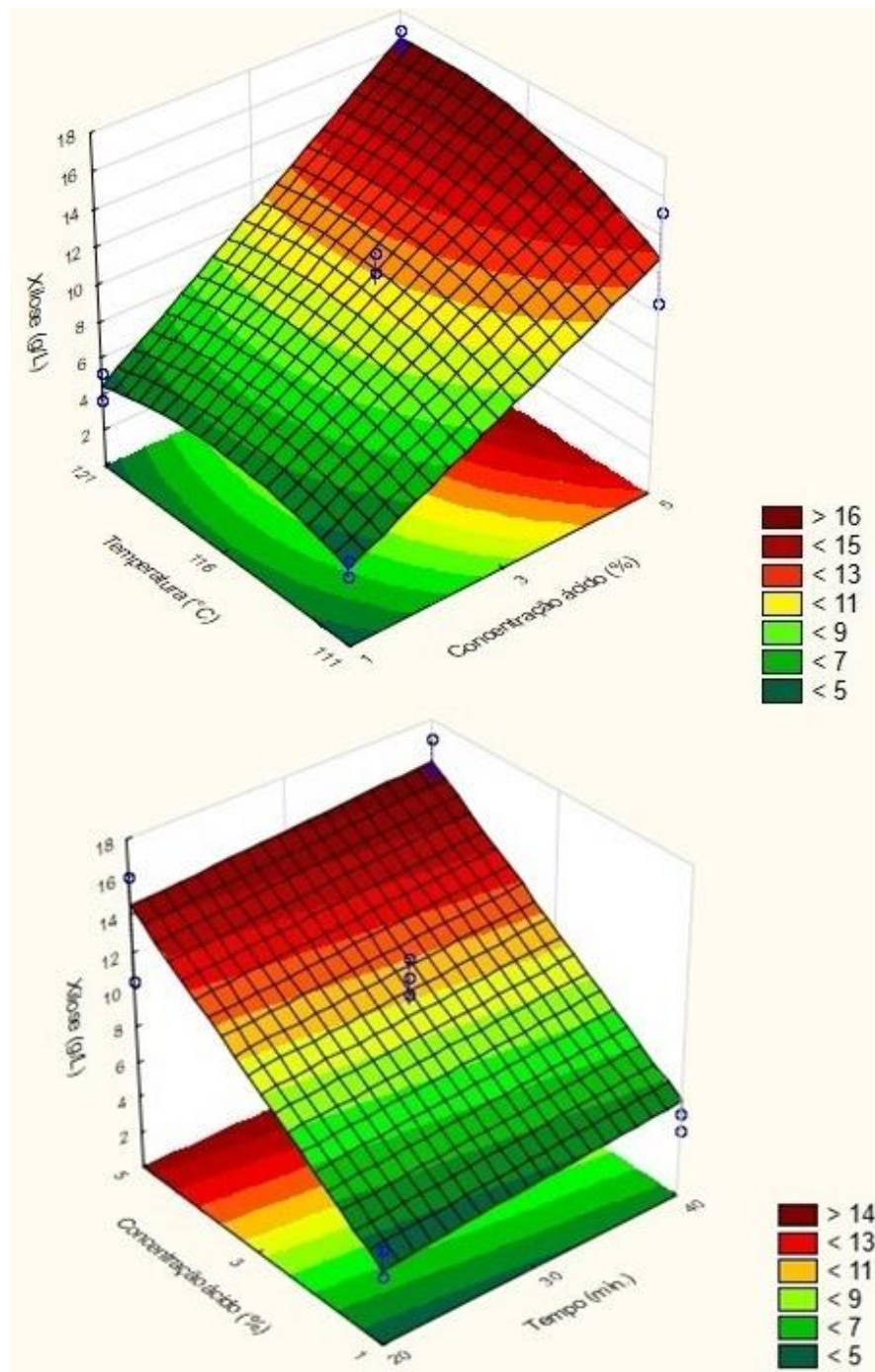
Fonte: Fonte: Autoria própria (2018).

O gráfico de Pareto posiciona em ordem decrescente as variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração do ácido) referindo aos seus efeitos na liberação de xilose, sendo que os mais significativos estão após a linha vermelha ( $p=0,5$ ). Verifica-se na Figura 10, que o fator concentração do ácido foi o fator que resultou a direta na liberação da xilose, sendo que resultou um efeito de aproximadamente 9,6 vezes a na concentração de xilose no nível +1, quando comparado com o nível -1, enquanto que os demais fatores não apresentaram significância.

Verifica-se ainda na Figura 10, que as combinações da concentração do ácido e da temperatura (1Lby3L), da temperatura com o tempo (1Lby2L) e do tempo com a concentração do ácido (2Lby3L), tiveram uma influência bem próximas, mas, mas não apresentam uma interação significativa.

A Figura 11 apresenta um gráfico de superfície de resposta dos dados reportados na Figura 10. Nesta figura, é possível observar as influências dos fatores independentes (variáveis), variando os níveis do planejamento, sobre a concentração da xilose no pré-tratamento com ácido diluído dos resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja.

**Figura 11-** Superfície de resposta da concentração de xilose a partir da hidrólise ácida do resíduo da soja



Fonte: Autoria própria (2018).

No presente trabalho, de acordo com o gráfico de superfície de resposta, somente o fator da concentração do ácido teve efeito na obtenção de xilose, enquanto a temperatura foi menos significativa que a concentração do ácido.

Portanto, melhor condição foi alcançada quando a concentração do ácido e a temperatura foram avaliadas em seus níveis superiores. Assim, a condição que apresentou valor mais elevado na concentração de xilose foi à 121°C, com a concentração de ácido de 5% (m/v), um tempo de reação de 40 minutos, correspondendo a uma concentração de xilose igual a 16,960 g/L. Como o fator tempo não foi significativo, então, a condição de 121°C, concentração de ácido de 5% (m/v) e tempo de reação de 20 minutos, apesar de ter-se obtido um resultado com menor concentração de xilose (16,056 g/L), esta foi escolhida como a melhor condição. Verifica-se que este valor de concentração de xilose foi apenas 5,33% inferior à máxima obtida, além do fato de redução do tempo de reação ser vantajosa economicamente, já que menos tempo no processo foi gasto.

A seguir na Tabela 8, são apresentados os valores obtidos para os compostos fenólicos para o planejamento experimental.

**Tabela 8** – Concentrações de fenóis presentes nas amostras após hidrólise ácida dos resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja

Amostra	Temp. (°C)	Tempo (min)	[ ] ácido	Concentração de fenóis (g/L)
1	(-1) 111	(-1) 20	(-1) 1%	0,5824
2	(+1) 121	(-1) 20	(-1) 1%	1,2615
3	(-1) 111	(+1) 40	(-1) 1%	0,9501
4	(+1) 121	(+1) 40	(-1) 1%	1,2777
5	(-1) 111	(-1) 20	(+1) 5%	1,3028
<b>6</b>	<b>(+1) 121</b>	<b>(-1) 20</b>	<b>(+1) 5%</b>	<b>1,6904</b>
7	(-1) 111	(+1) 40	(+1) 5%	1,6295
<b>8</b>	<b>(+1) 121</b>	<b>(+1) 40</b>	<b>(+1) 5%</b>	<b>2,1735</b>
9	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	1,6107
10	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	1,6248
11	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	1,7045
12	(0) 116	(0) 30	(0) 3%	1,4841

Fonte: Fonte: Autoria própria (2019).

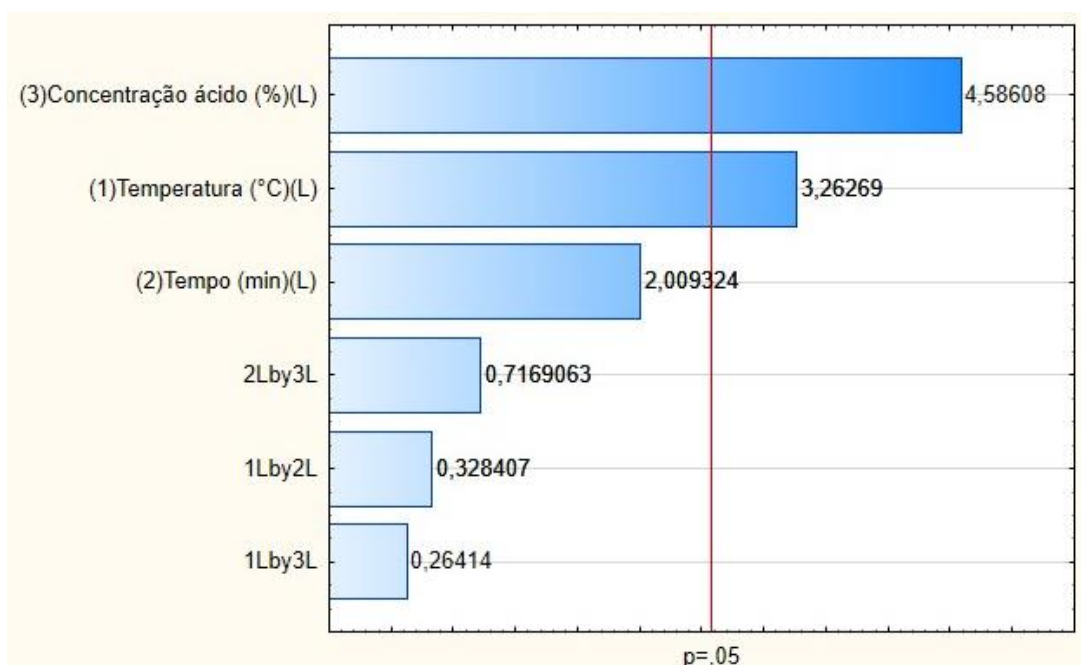
Na Tabela 8, a amostra 8 possui o maior valor de concentração de fenóis totais, compostos estes, conforme já discutido anteriormente, são considerados

tóxicos aos micro-organismos, pois, prejudica o metabolismo, inibindo o crescimento e conseqüentemente, diminuindo o rendimento da produção de etanol (ZAUTSEN, 2011).

Portanto, a amostra 8 e 6, as quais apresentaram as melhores condições de obtenção de xilose, verificou-se (Tabela 8) concentrações de 2,1735 g/L e 1,6904 g/L, respectivamente de fenóis. Conforme já discutido anteriormente, a amostra 6, apresentou um valor inferior (5,33%) de xilose, comparado a amostra 8, porém uma diferença pouco significativa, o que gera economia pela diferença de tempo de pré-tratamento. Também é possível notar que esta apresentou menor concentração de compostos fenólicos, portanto sua escolha pode ser justificada aliada à menor concentração destes compostos.

Na Figura 12, verificamos que, assim como para resposta em xilose, a concentração do ácido também apresentou a maior influência na resposta dos compostos fenólicos. No entanto, neste caso, verificou-se que a temperatura, também apresentou um efeito direto nesta resposta.

**Figura 12-** Gráfico de Pareto para Compostos Fenólicos



Fonte: Fonte: Autoria própria (2019).

Também observa-se na Figura 12, que quando aplicado a combinação da concentração do ácido com o tempo (2Lby3L), há maior resposta de compostos fenólicos, mas não apresenta efeito significativo.

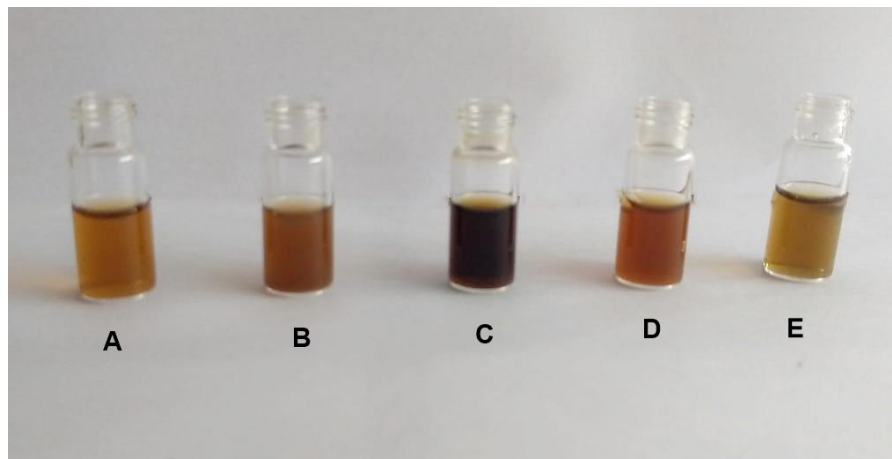
### 5.3 Concentração e Tratamento do Hidrolisado

A condição da amostra 6 (121°C, ácido à 5% (m/v) e 20 minutos), melhor condição de obtenção de hidrolisado hemicelulósico, foi preparada, novamente, para obter cerca de 10 L de hidrolisado.

Após este ser concentrado, o mesmo foi novamente avaliado quando ao teor de açúcares fermentescíveis e compostos fenólicos, apresentando 44,23 g/L de xilose e 6,74 g/L de fenóis.

Portanto, o hidrolisado apresentou altos teores de compostos fenólicos, sendo assim, foi submetido à um tratamento, objetivando a remoção destes. A Figura 13, a seguir, ilustra os hidrolisados obtidos das diferentes etapas de tratamento empregadas no presente trabalho.

**Figura 13-** Hidrolisados obtidos em função das diferentes etapas dos procedimentos de destoxificação



Legenda: [A] – Hidrolisado original; [B] – Hidrolisado concentrado; [C] – Hidrolisado tratado com óxido de cálcio; [D] – Hidrolisado tratado com óxido de cálcio + ácido fosfórico; [E] – Hidrolisado tratado com óxido de cálcio + ácido fosfórico + adsorção por carvão ativo.

Fonte: Autoria própria (2019).

Após o procedimento de destoxificação, obteve-se cerca de 1,92 g/L de fenóis, resultando em remoção de 71,5% deste composto presente no hidrolisado concentrado, como expressa a Tabela 9.

**Tabela 9-** Avaliação da destoxificação do hidrolisado

<b>Amostra</b>	<b>Compostos fenólicos (g/L)</b>	<b>pH</b>
Hidrolisado inicial	1,6904	0,45
Hidrolisado concentrado	6,7392	0,39
Hidrolisado concentrado e destoxificado	1,9200	2,50

Fonte: Autoria própria (2019).

No entanto, durante o processo de obtenção, concentração e destoxificação do hidrolisado, perdeu-se volume do mesmo, principalmente com o procedimento de destoxificação, por consequência da precipitação entre as etapas do tratamento do mesmo, como mostra a Tabela 10.

**Tabela 10-** Perdas de volume do hidrolisado durante as etapas

<b>Amostra</b>	<b>Volume</b>	<b>% de perdas</b>
Hidrolisado inicial	10 L	-
Hidrolisado após o pré-tratamento	6,8 L	32,0%
Hidrolisado concentrado 3x	2,2 L	67,0%
Hidrolisado concentrado e destoxificado	0,6 L	72,7%

Fonte: Autoria própria (2019).



## 5.4 Fermentação do Hidrolisado Proveniente dos Materiais Oriundos da Produção e Beneficiamento de Soja

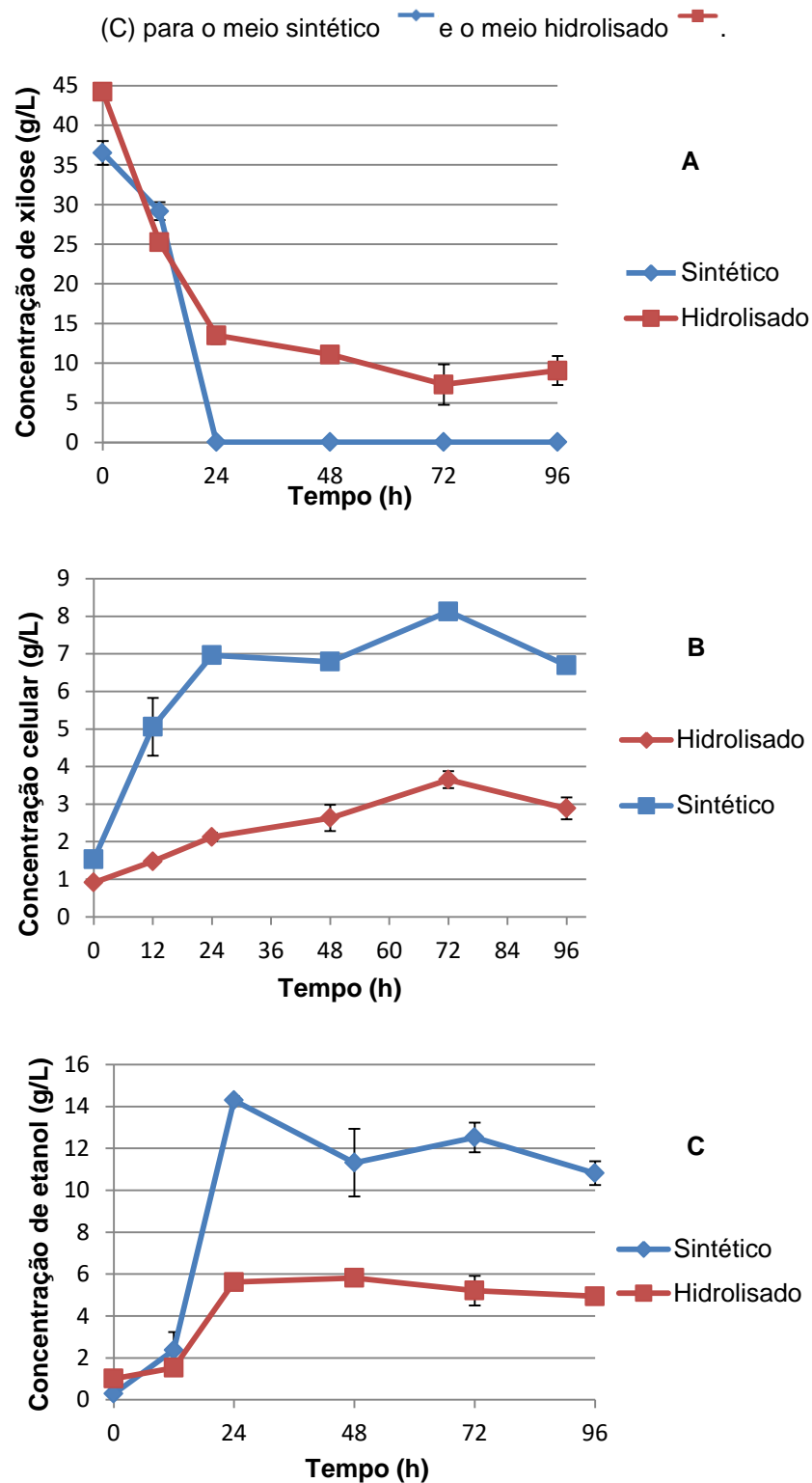
### 5.4.1 Avaliação do consumo do substrato, produção de etanol e crescimento celular durante cultivo em hidrolisado e meio sintético (experimento controle)

As fermentações ocorreram como descritas no item 4.5.3, sendo os perfis cinéticos tanto para o hidrolisado concentrado e destoxificado, bem como para o meio sintético estão apresentados na Figura 14.

De acordo com a Figura 14-A, verificou-se um rápido consumo do substrato (xilose) no meio sintético, uma vez que este em apenas 24h de fermentação foi totalmente consumido (99,84%), enquanto no hidrolisado esse comportamento não foi observado. O consumo ao final de 72h de fermentação alcançou 83,48% quando da utilização de hidrolisado. Este resultado pode ser explicado devido aos compostos tóxicos presentes no mesmo, principalmente fenólicos (Tabela 9), ácido acético, furfural e 5-HMF (compostos não analisados), mas previamente reportado em hidrolisados de outros materiais lignocelulósicos (CAMARGO, 2016; COSTA, 2016; ARRUDA, 2011).

Ainda para a Figura 14-A, verificou-se que conforme discutido no item 5.3, mesmo com a destoxificação do hidrolisado, este ainda apresentou 1,920 g/L de compostos fenólicos e considerando que, segundo Wang *et al.*, (2017), concentrações de fenóis de 0,2 g/L, para a levedura *Pichia stipitis*, já são consideradas tóxicas e inibitórias para os micro-organismos assimiladores de xilose. Ainda de acordo com estes autores, a presença destes compostos resulta em danos na membrana celular, ocasionando a diminuição do consumo de substrato. Costa (2016), verificou que 28,98 g/L  $\pm$  3,95% de xilose foi consumida do meio contendo 90% do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, em 72 h, para o mesmo microrganismo, sendo este consumo, aproximadamente 21,5% menor do que o observado em relação ao presente trabalho.

**Figura 14-** Avaliação do consumo de xilose (A), do crescimento de células (B) e produção de etanol



Fonte: Autoria própria (2019).

Com relação ao crescimento de células (Figura 14-B) observou-se valores mais elevados em meio sintético (atingindo-se máximo de 8,130 g/L), enquanto no hidrolisado, foi possível obter, somente, 3,652 g/L. Este valor foi 55,08% menor que o meio de controle, podendo-se verificar mais uma vez, o efeito inibitório dos compostos fenólicos. Provavelmente, assim como estes influenciaram o consumo de açúcares e produção de etanol, podem ter prejudicado o metabolismo da célula, inibindo seu crescimento. Verifica-se, ainda, que apesar da concentração celular ao final da fermentação em meio hidrolisado ser inferior ao controle, apresentou um valor semelhante, ao ser comparado com o trabalho de Costa (2016), o qual avaliou o mesmo microrganismo, porém empregando-se 90% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Na Figura 14-C, verifica-se que a máxima formação de etanol ocorreu em 24 horas, tanto no meio sintético (14,29 g/L), como no hidrolisado (5,62 g/L). No entanto, a concentração de etanol foi 60,67% menor no hidrolisado, pois, assim como para a assimilação de açúcares, para a produção de etanol, o possível efeito dos inibidores também foi verificado. Segundo Wang *et al.*, (2017), que avaliou a fermentação do hidrolisado da palha de arroz, com o microrganismo *Pichia stipitis* para a produção de etanol, a formação deste álcool foi menor, cerca de 21,26%, em função da presença de compostos fenólicos, sendo que mesmo estes, em pequenas quantidades, já tem um efeito negativo na formação deste bioproduto.

#### 5.4.2 Avaliação dos parâmetros fermentativos

As Tabelas 11 e 12 apresentam os parâmetros fermentativos, obtidos para os meios sintético e hidrolisado.

**Tabela 11-** Parâmetros fermentativos para o meio hidrolisado

Tempo (h)	$Y_{P/S}$ (g <sub>etanol</sub> ·g <sub>xilose</sub> <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>celúlas</sub> ·g <sub>xilose</sub> <sup>-1</sup> )	$Q_p$ (g <sub>etanol</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	$\eta\%$
0	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,081	0,029	0,127	15,76
<b>24</b>	<b>0,183</b>	<b>0,039</b>	<b>0,234</b>	<b>35,79</b>
48	0,175	0,044	0,121	34,32
72	0,141	0,074	0,072	27,60
96	0,140	0,056	0,051	27,48

Fonte: Autoria própria (2019).

**Tabela 12-** Parâmetros fermentativos para o meio sintético

Tempo (h)	$Y_{P/S}$ ( $g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{xilose}}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $g_{\text{células}} \cdot g_{\text{xilose}}^{-1}$ )	$Q_p$ ( $g_{\text{etanol}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$\eta\%$
0	0	0	0	0
12	0,323	0,481	0,198	63,28
<b>24</b>	<b>0,392</b>	<b>0,149</b>	<b>0,596</b>	<b>76,73</b>
48	0,307	0,144	0,233	60,02
72	0,344	0,181	0,174	67,24
96	0,296	0,141	0,113	58,06

Fonte: Autoria própria (2019).

De acordo com as Tabelas 11 e 12, os máximos valores de parâmetros fermentativos foram obtidos em 24h de fermentação para ambos os meios. Conforme verificado no item 5.4.1, a presença de compostos fenólicos são considerados inibitórios ao metabolismo microbiano no hidrolisado, prejudicou a performance fermentativa da levedura neste meio, em comparação ao meio sintético. Nota-se, valor máximo de  $0,183 g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{xilose}}^{-1}$ , para fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) resultando em um rendimento máximo ( $\eta$ ) de 35,29% e com uma produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) de  $0,234 g_{\text{etanol}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$  em meio hidrolisado Já para o meio sintético (Tabela 12), observa-se que a conversão de substrato em produto, teve seu máximo de  $0,392 g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{xilose}}^{-1}$ , correspondendo a uma produtividade volumétrica de  $0,596 g_{\text{etanol}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$  e com um rendimento de 76,73%. Assim, ao se comparar as produtividades volumétricas obtidas experimentalmente nos meios hidrolisado e sintético, observa-se que o primeiro resultou em 60,74% de redução em seu valor em relação ao segundo, evidenciando mais uma vez que a presença de compostos tóxicos prejudicaram o metabolismo microbiano.

Segundo Camargo (2016), é praticamente impossível obter o rendimento máximo teórico, ou seja, 100% de eficiência de conversão, uma vez que uma parcela do substrato é desviada tanto para o crescimento e manutenção das células, quanto para formação de subprodutos do metabolismo, conforme é apresentado pelo fator  $Y_{X/S}$  (Tabelas 11 e 12).

Martiniano *et al.*, (2013) avaliou a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, pela levedura *S. arborariae* (BR6-2AY), obtendo uma produtividade em etanol de  $0,11 \pm 0,004 g/L \cdot h$ , em 96 horas de fermentação, sendo este resultado de 52,99% inferior ao obtido no presente trabalho. Já Costa (2016),

em ensaio realizado com 90% m/m do hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em meio rico YP, para cultivo da levedura *S. passalidarum*, visando a obtenção de etanol, apresentou uma produtividade volumétrica de  $0,24 \pm 0,01$  g/L.h, sendo uma produtividade próxima ao obtido desse presente trabalho, evidenciando a potencialidade do meio empregando para a obtenção de etanol de segunda geração.

## 6 CONCLUSÕES

Conclui-se nesse presente trabalho que:

- Os resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja apresentaram teores de 11,9% de umidade, 5,75% de cinzas totais, 3,41% de extrativos e 19,39% de lignina solúvel, valores estes considerados dentro da faixa normalmente observada na literatura para outros materiais lignocelulósicos;
- A partir do planejamento DCC 2<sup>3</sup> foi possível obter a melhor condição de pré-tratamento da fração hemicelulósica. Verificou-se que a concentração de ácido apresentou o efeito mais significativo no pré-tratamento dos resíduos oriundos da produção e do beneficiamento de soja na obtenção de xilose, enquanto o parâmetro de temperatura teve uma influência, mas não tão intensa como a da concentração do ácido e o tempo teve uma influência insignificativa.
- O processo de destoxificação por variação do pH e adsorção em carvão ativo, permitiu remoção de mais de 71% da quantidade de compostos fenólicos, porém, não foi suficiente para alcançar elevados parâmetros fermentativos nesta condição, em comparação ao meio sintético;
- Foi possível a produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado pelo microrganismo *S. passalidarum*, resultando em parâmetros fermentativos com valores de  $Q_P$  de 0,234 g/L.h e  $Y_{P/S}$  de 0,183 g/g, o que estimula as pesquisas para o aproveitamento deste material. No entanto verifica-se a necessidade de um procedimento de destoxificação mais eficiente, avaliar outros compostos inibitórios, e obter a melhor condição do processo fermentativo.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam o potencial da utilização dos materiais oriundos da produção e beneficiamento de soja como fonte de carbono, principalmente xilose, a qual poderá ser utilizada em diferentes processos fermentativos, como por exemplo, para a obtenção de bioetanol a partir de microorganismos fermentadores desta pentose. A escolha deste bioproduto se deve ao fato deste ser um biocombustível sustentável, o que poderá contribuir para a redução das mudanças climáticas sem afetar a oferta de alimentos, além de agregar valor a um material que geraria pouco valor agregado na cadeia da agroindústria.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** Tese (Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial), Lorena- SP, 2011.

ATCC- American Type Culture Collection. ***Spathaspora passalidarum***. 2018. Disponível em:< <https://www.atcc.org/products/all/MYA-4345.aspx#documentation>>. Acesso em: 14 de Março de 2019.

BARBOSA, M. **Produção de etanol a partir da palha de cevada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Ipb, 2011.

BOLZAN, R. C. **Bromatologia.** UFSM, Frederico Westphalen, RS, 2013. Disponível em: [http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/cafw/tecnico\\_agroindustria/bromatologia.pdf](http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/cafw/tecnico_agroindustria/bromatologia.pdf)>. Acessado em: 21 de Março de 2018.

BUZZATTI, G. W.; PORTELLA, M. D. Recorde de Produtividade! Mas aonde vai tanta soja? **Revista Atualidades.** Ano XIII, nº 151, maio, 2016, p. 18. Disponível em: <<http://cotripal.com.br/anexos/atualidades151.pdf>>. Acessado em: 21 de Março de 2018.

CAMARGO, D. **Produção biotecnológica de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino.** Tese (doutorado em Engenharia Agrícola), Cascavel, 2016.

CARNEIRO, L. M. **Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol.** Tese (Pósgraduação em Biotecnologia Industrial). Lorena, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos. V.5 – Safra 2017/18- N.6 – Sexto levantamento, Março, 2018.** Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18\\_03\\_13\\_14\\_15\\_33\\_grao\\_marco\\_2018.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marco_2018.pdf)>. Acessado em: 21 de Março de 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos. V.6 – Safra 2018/19- N.8 – Oitavo levantamento, Maio, 2019.** Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acessado em: 08 de Junho de 2019.

COSTA, A. K. B. **Estudo da fermentação de hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela linhagem *Spathaspora passalidarum*.** UFMG-HMD 14.1. UNICAMP, (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química). Campinas, 2016.



DERAL – Departamento de Economia Rural. **Valor Bruto da Produção: 2017.** Curitiba, 2018. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Graficos\\_municipais\\_VBP\\_graregi\\_2017.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Graficos_municipais_VBP_graregi_2017.pdf)>. Acessado em: 26 de Fevereiro de 2019.

DOMÍNGUEZ, J.M.O. **Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*.** Tese de Doutorado. Universidad Complutense de Madrid, 2003.

EISFELD, R. L.; NASCIMENTO, F. A. F. **Mapeamento dos Plantios Florestais do Estado do Paraná – Pinus e Eucalyptus.** Instituto de Florestas do Paraná. Curitiba, 2015. Disponível em: <[http://www.florestasparana.pr.gov.br/arquivos/File/Mapeamento/Publicacao\\_Mapeamento\\_Site\\_02.pdf](http://www.florestasparana.pr.gov.br/arquivos/File/Mapeamento/Publicacao_Mapeamento_Site_02.pdf)>. Acessado em: 15 de Março de 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Atividades Econômicas: Solos. Sistemas de Produção; 1.** ISSN 1679-012, versão eletrônica – 3° edição. Nov, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio\\_sisal/arvore/CONT000fckl80cd02wx5eo0a2ndxy9o28e5x.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckl80cd02wx5eo0a2ndxy9o28e5x.html)>. Acessado em: 21 de Março de 2018.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (safra 2017/2018).** 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em: 29 de Junho de 2019.

FELIPE, M. G. A. *et al.* **Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v.18, p.251-254, 1997.

FRANCHINI, J. C. *et al.* **Variabilidade espacial e temporal da produção de soja no Paraná e definição de ambientes de produção.** Embrapa Soja. Londrina, PR, 2016.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*.** 2009. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

FONSECA, B. G. **Avaliação das condições de tratamento biológico de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces (Picha) stipitis*.** Lorena, 2014.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Picha stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico, de bagaço de malte.** Lorena, 2012.

GARLOCK, R. J. *et al.* **Comparative Material Balances Around Pretreatment Technologies for the Conversion of Switchgrass to Soluble Sugars.** Bioresource Technology, v. 102, n. 2, p. 123- 131, 2011.

GONÇALVES, C. **Aplicação de Agentes Oxidantes no Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar e Sua Influência na Sacarificação da Celulose.** Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Bioquímicos), São Caetano do Sul, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. **Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-açúcar.** Quim. Nova, Vol. 32, nº6, 1500-1503, 2009.

LALUCE C. *et al.* **Advances and Developments in Strategies to Improve Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and Processes to Obtain the Lignocellulosic Ethanol—A Review.** Biochem Biotechnol (2012) 166:1908–1926, 2012.

LARSSON, S. (2000) **Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance.** Tesis doctoral. Lund. Suecia.

LIMAYER, A.; RICKE, S. C. **Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current perspectives, potential issues and future prospects.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

HATTI, P. **Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocelluloses.** 2004. Tese (Doutorado em Tecnologia). University of Technology, Espoo, Finlândia, 2004. Disponível em: < <http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>>. Acessado em: 14 de Março de 2018.

MACHADO, C. M. M. *et al.* **Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. Revisa de Política Agrícola.** Ano XV – Nº 3 – Jul./Ago./Set. 2006. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/121716/1/Paginasdepolagr0320062p.6478.pdf>> Acesso em: 19 de Maio de 2018.

MARTINIANO, S. E.; CHANDEL, A. K.; SOARES, L. C. S. R.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, S. S. **Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse.** 3 Biotech, Heidelberg, v. 3, n. 5, p. 345-352, 2013.

MARTINS, E. H. **Aproveitamento do Resíduo do Processamento da Soja para Produção de Painéis Aglomerados.** UFG. Jataí, GO. Julho de 2015.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA-SILVA, J. B.; PESSOA-JÚNIOR, A. **Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 9-21, janeiro-março 2006.

MASIERO, L. C. **Preparo de Grãos de Soja para Extração.** Disponível em: < <http://www.oleosegorduras.org.br/arquivos/sbog/objetivos/preparo-graos-soja-para-extracao.pdf>>. Acessado em: 21 de Março de 2018.

MATOS, A. T. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Fundação Estadual do Meio Ambiente- Cuso sobre tratamento de resíduos. Maio de 2015.

MATSUSHIKA, *et al.* **Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives**. Appl Microbiol Biotechnol, v.84, p.37–53, 2009.

MILLATI, R; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. **Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolysates**. Enzyme Microb Technol, v.36, p. 294-300, 2005.

MIRION, J.; YOSEF, E.; BEM-GHEDALIA, D. **Composition and in Vitro Digestibility of Monosaccharide Constituents of Selected Byproduct Freeds**. J. Agric. Food Chem. 2001, 49. 2322-2326.

MORAES, E. J. C. **Estudo de Viabilidade Econômica da Produção de Xilitol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2008.

MORAIS, A. P. S.; BROETTO, F. **Pré-hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-açúcar e sua Caracterização Físico-química**. Revista Energia na Agrucultura, Botucatu, vol. 27, n. 4, p. 01-12, 2012.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. **Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I- Estudos dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis**. Viçosa- MG, v. 29, n.3, p. 461-470, 2005.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. M; SILVA, A. S; ABUD, A. K. S. **Influência de inibidores na fermentação etanólica de xilose por *pichia stipitis***. COBEQ, Florianópolis, 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74, p.17- 24, 2000.

PEDRO, N. C. R. M., **Avaliação do potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival**. Tese (Doutorado em Química) – Escola Superior Agrária, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. **Role of Pretreatment and Conditioning Processes on Toxicity of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates**. Celulose, 2009. 16:743–762.

ROJAS, M. J. **Produção de Etanol e Hidrolisado Protéico da Casca de Soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). São Carlos, UFSCar, 2012.

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). UNICAMP, Campinas- SP, 2010.

SANTOS, A. M. **Caracterização química da biomassa: Potencial da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (mestrado em Energia da biomassa). Rio Largo - AL, 2018.

SANTOS, M. S. R. **Estudo de Pré-tratamentos de Palha e Sabugo de Milho Visando a Produção de Etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Maceió, 2014. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1204/1/Estudo%20de%20pr%C3%A9%20tratamentos%20de%20palha%20e%20sabugo%20de%20milho%20visando%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol%202G.pdf>> Acessado em: 13 de Março de 2018.

SARKAR, N. et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview**. Renewable Energy, West Bengal, v.37, 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a Partir da Biomassa Residual da Indústria de Celulose**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos). Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipits* empregando hidrolisado de palha de arroz**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia industrial). Lorena, 2007.

SILVA, R. F. **Conversão Enzimática de Resíduos Derivados do Processamento do *Pinus elliotti* Para Obtenção de Bioetanol**. Campo Mourão, Paraná, 2014. Disponível em: <[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5852/1/CM\\_COEAM\\_2014\\_2\\_17.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5852/1/CM_COEAM_2014_2_17.pdf)> Acessado em: 13 de Março de 2018.

SILVA, R. O. **Utilização dos resíduos sólidos da indústria cacaeira para a produção de etanol**. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). Alegre - RS, 2018.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent**. Methods in Enzymology, New York, v. 199, p. 152-178, 1999.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of extractives in biomass in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. NREL , p. 12, 2008. ISSN Report No. TP-510-42619.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Etanol and Biogás Production: A review.** International Journal of Molecular Sciences, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

UNIPROT. **Proteomes - *Spathaspora passalidarum* (strain NRRL Y-27907 / 11-Y1).** 2019. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000709>>. Acessado em: 03 de Jul. de 2019.

WANG, X.; TSANG, Y. F.; LI, Y.; MA, X.; CUI, S.; ZHANG, T.; HU, J.; GAO, M. **Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during etanol fermentation by *Pichia stipitis*.** Bioresource Technology, V.244, p. 1059-1067. November, 2017.

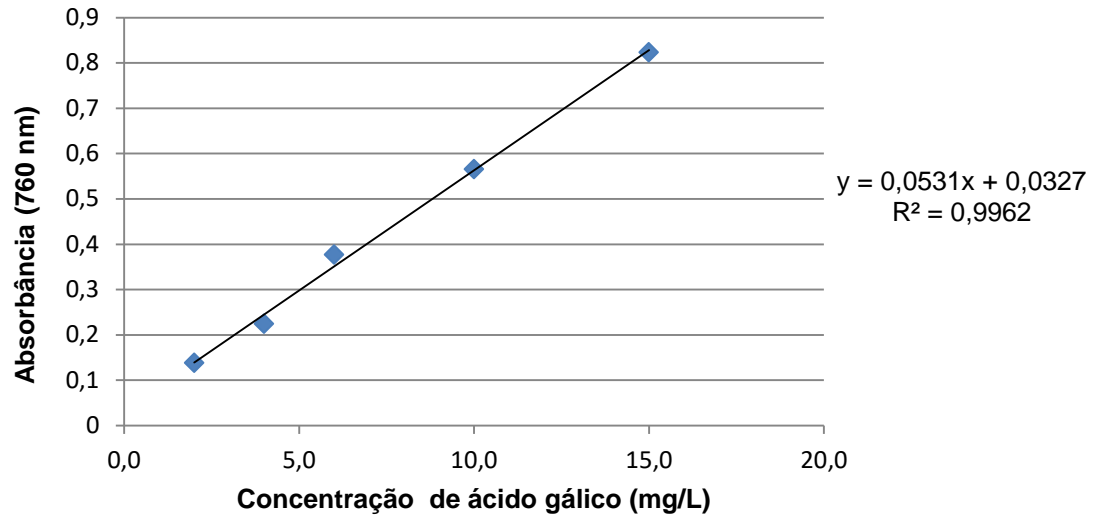
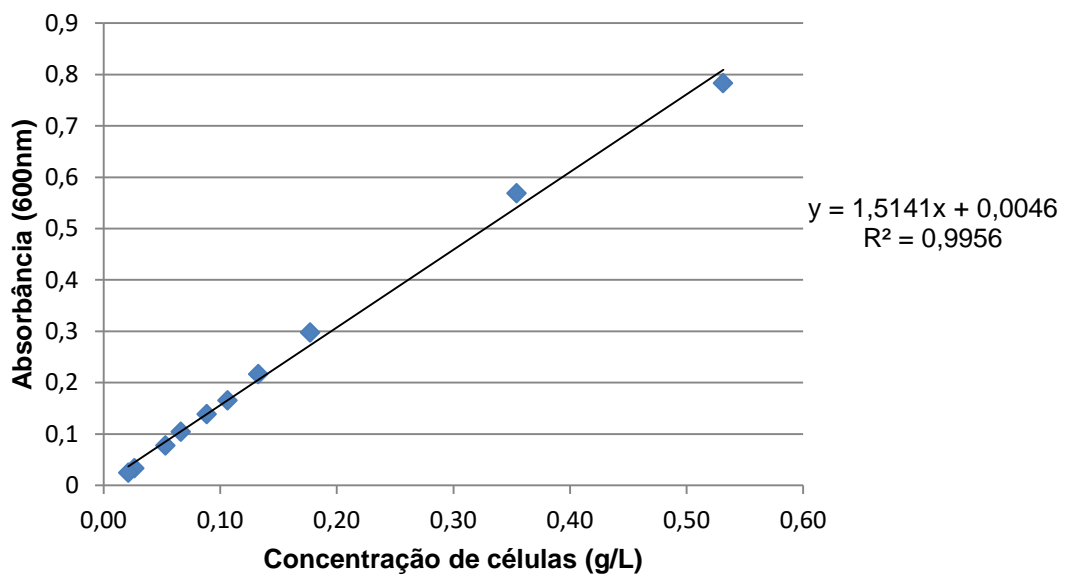
ZAUTSEN, R. R. M. **Fermentação Alcoólica e Extração Líquido-Líquido Simultânea de Etanol e Inibidores Provenientes de Caldo Hidrolítico de Biomassa Lignocelulósica.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Campinas, 2011.

ZHANG, Y. H. P. **Reviving the Carbohydrate Economy Via Multi-product Lignocellulose Biorefineries.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, Volume 35, Number 5, Page 367.

## APÊNDICES

## ÍNDICE DE APÊNDICES

APÊNDICE A- Curva padrão para determinar compostos fenólicos .....	64
APÊNDICE B- Curva padrão de peso seco para <i>Spathaspora passalidarum</i> .....	64
APÊNDICE C- Resultados do crescimento celular para a fermentação.....	65
APÊNDICE D- Resultados do consumo de xilose para a fermentação.....	66
APÊNDICE E- Resultados da produção de etanol para a fermentação .....	67

**APÊNDICE A-** Curva padrão para determinar compostos fenólicos**APÊNDICE B-** Curva padrão de peso seco para *Spathaspora passalidarum*



**APÊNDICE C-** Resultados do crescimento celular para a fermentação

<b>HIDROLISADO</b>				
<b>Tempo (h)</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>Médio (g/L)</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	0,896	0,932	0,914	0,026
12	1,493	1,460	1,476	0,023
24	2,054	2,200	2,127	0,103
48	2,879	2,384	2,632	0,350
72	3,491	3,814	3,652	0,228
96	3,093	2,681	2,887	0,291

<b>SINTÉTICO</b>				
<b>Tempo (h)</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>Médio (g/L)</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	1,513	1,543	1,528	0,021
12	5,604	4,514	5,059	0,771
24	6,958	6,974	6,966	0,011
48	6,941	6,644	6,792	0,210
72	8,114	8,147	8,130	0,023
96	6,644	6,743	6,694	0,070

**APÊNDICE D-** Resultados do consumo de xilose para a fermentação

<b>HIDROLISADO</b>				
<b>Tempo (h)</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>Médio (g/L)</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	43,746	44,713	44,229	0,684
12	25,600	24,898	25,249	0,496
24	14,268	12,741	13,504	1,079
48	11,214	10,947	11,080	0,189
72	9,113	5,501	7,307	2,554
96	7,763	10,363	9,063	1,839

<b>SINTÉTICO</b>				
<b>Tempo (h)</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>Médio (g/L)</b>	<b>Desvio padrão</b>
0	37,581	35,444	36,512	1,511
12	28,360	29,978	29,169	1,144
24	0,056	0,056	0,056	0,000
48	0,055	0,055	0,055	0,000
72	0,0566	0,057	0,057	0,001
96	0,0564	0,055	0,056	0,000

## APÊNDICE E- Resultados da produção de etanol para a fermentação

HIDROLISADO				
Tempo (h)	A (g/L)	B (g/L)	Médio (g/L)	Desvio padrão
0	1,265	0,755	1,010	0,361
12	1,628	1,429	1,528	0,141
24	5,872	5,368	5,620	0,356
48	6,058	5,569	5,814	0,346
72	4,707	5,710	5,208	0,709
96	4,823	5,053	4,938	0,162

SINTÉTICO				
Tempo (h)	A (g/L)	B (g/L)	Médio (g/L)	Desvio padrão
0	0,296	0,279	0,287	0,012
12	1,771	2,978	2,374	0,854
24	14,425	14,163	14,294	0,185
48	12,458	10,176	11,317	1,614
72	13,026	12,026	12,526	0,707
96	10,418	11,216	10,817	0,564