

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

GUILHERME ARIELO RODRIGUES MAIA

**OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO EXTRATO AQUOSO DA  
POLPA DE JERIVÁ (*Syagrus romanzoffiana*)**

PONTA GROSSA

2013

GUILHERME ARIELO RODRIGUES MAIA

**OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO EXTRATO AQUOSO DA  
POLPA DE JERIVÁ (*Syagrus romanzoffiana*)**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Mestrado em Bioenergia, Área de Concentração: Biocombustíveis.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Regina Masetto Antunes.

**Coorientador:** Prof. Dr. Dionísio Borsato

PONTA GROSSA

2013

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Maia, Guilherme Arielo Rodrigues  
M217 Otimização da fermentação alcoólica do  
extrato aquoso da polpa de Jerivá (*Syagrus  
romanzoffiana*) / Guilherme Arielo Rodrigues  
Maia. Ponta Grossa, 2013.  
63f.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia -  
Área de Concentração: Biocombustíveis),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. Sandra Regina  
Masetto Antunes.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Dionísio  
Borsato.

1. Delimitação experimental. 2. Etanol.  
3. Levedura. 4. Simplex. I. Antunes, Sandra  
Regina Masetto. II. Borsato, Dionísio.  
III. Universidade Estadual de Ponta  
Grossa. Mestrado em Bioenergia. IV. T.

CDD: 661.8

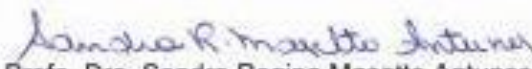
## TERMO DE APROVAÇÃO

GUILHERME ARIELO RODRIGUES MAIA

### OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DE JERIVÁ (*Syagrus romanzoffiana*)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa e aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora

  
Profa. Dra. Sandra Regina Masetto Antunes  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

  
Prof. Dr. Luciano Farinha Watzlawick  
Universidade Estadual do Centro Oeste

  
Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2013.

Dedico à Deus, minha família, minha namorada, meus amigos, meus professores orientadores pela dedicação, apoio, amizade e direção nos momentos certos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me manter nos seus caminhos e por guiar meus passos até aqui.

Aos meus pais Elaine e Valdemir, que investiram além do amor e carinho, a confiança de que eu sempre seria capaz.

Ao meu irmão Matheus, que além de irmão se tornou um companheiro.

À minha namorada, Jaqueline, que sempre esteve ao meu lado e sempre estará.

Aos meus amigos e parceiros, Katia, Rodrigo, Allan, Carol e Leninha pela amizade e companhia.

À minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Masetto Antunes pela paciência e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Dionísio Borsato por me conduzir neste trabalho.

À amiga Silvia Borba, pela atenção e pelo aprendizado durante esses dois anos.

Aos colegas de trabalho do LPAC - Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis da Universidade Estadual de Londrina – pela ajuda no processo da realização deste trabalho.

À meu tio Paulo pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do PPG Bioenergia 2011.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de estar calado, e tempo de falar;”

Eclesiastes 3:1-2, 4,7

## RESUMO

O Brasil é um dos países mais avançados, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível. O etanol é usado na sua maior parte na mistura da gasolina, e aplicado como uso exclusivo de combustível direto, no Brasil. Para sua obtenção se pode utilizar de diferentes formas de biomassa, sendo a cana de açúcar no a principal fonte de geração do combustível. No processo de produção de etanol vários fatores interferem no rendimento. O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições do processo de fermentação alcoólica do extrato aquoso da polpa de jerivá, utilizando a metodologia de superfície de resposta e otimização simplex. Foi empregado o delineamento fatorial incompleto  $3^3$  tendo o extrato de levedura,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e levedura, como variáveis independentes e o rendimento da produção de álcool como resposta. A análise da regressão mostrou que o modelo é preditivo e a otimização simplex indicou uma formulação contendo  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $6,33 \text{ g L}^{-1}$  de levedura e  $0,30 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  para um rendimento ótimo de produção de etanol de 85,40%. Para a validação da equação preditiva o experimento foi repetido em triplicata, nas condições ótimas estabelecidas, obtendo-se um valor médio de 87,15% de rendimento. Aplicando-se o teste t, verificou-se que não houve diferença significativa, em nível de 5%, entre o valor médio obtido e aquele indicado na otimização simplex.

**Palavras-chave:** delineamento experimental, etanol, levedura, simplex.

## ABSTRACT

Brazil is one of the most advanced countries, in the technological point of view, regarding the production and use of ethanol as fuel. It is used mostly in the gasoline blend, and is applied to exclusive use of direct fuel. In order to obtain it, different types of biomass can be explored, and sugar cane is both the main source of fuel generation. In the process of ethanol production, many factors may cause interference in expected yields. The aim of this study was to determine the best process conditions for fermentation of aqueous jerivá pulp extract using the response surface methodology and optimization simplex. Design was incomplete factorial  $3^3$  with yeast extract, yeast and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  as independent variables and ethanol yield, the response. Regression analysis showed that the model is predictive and the simplex optimization indicated a formulation containing  $0.35 \text{ g L}^{-1}$  yeast extract,  $6.33 \text{ g L}^{-1}$  yeast and  $0.30 \text{ g L}^{-1}$  and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , for an optimum yield of 85.40% ethanol. To validate the predictive equation, experiment was repeated in triplicate under optimum conditions, yielding, and an average yield of 87.15% was obtained. According to application of the t test, it was found that there was no significant difference, at 5% level, between the mean value obtained and the value obtained by simplex optimization.

**Keywords:** experimental design, ethanol, yeast, simplex.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Uso de combustível nos carros 0 km no Brasil, 2003-2007.<br>Fonte: MAPA, 2007.....                                                                                                                      | 20 |
| Figura 2 - Evolução da Produção Brasileira por Tipo de Álcool.<br>Fonte: ANFAVEA, 2005.....                                                                                                                        | 21 |
| Figura 3 - Jerivá, <i>Syagrus romanzoffiana</i> . Fonte: MAZZA, 2012.....                                                                                                                                          | 27 |
| Figura 4 - (a) Floração do Jerivá, (b) Frutos maduros, <i>Syagrus romanzoffiana</i> .<br>Fonte: MAZZA, 2012; SANTANA, 2011.....                                                                                    | 28 |
| Figura 5 - Interpretação geométrica do simplex para duas e três variáveis.<br>Fonte: BONA, 2000 .....                                                                                                              | 30 |
| Figura 6 - Movimento de reflexão em um simplex para duas variáveis.<br>Fonte: BONA, 2000.....                                                                                                                      | 32 |
| Figura 7 - Intervalos proibidos para os valores de $\beta$ .<br>Fonte: BARROS NETO <i>et al.</i> , 1995.....                                                                                                       | 33 |
| Figura 8 – Microdestilador, marca TE-012 Tecnal.<br>Fonte: o autor.....                                                                                                                                            | 40 |
| Figura 9 - Destilação fracionada com coluna de Vigreux.<br>Fonte: o autor.....                                                                                                                                     | 42 |
| Figura 10 - Cromatograma extrato da polpa de jerivá antes da<br>fermentação alcoólica.....                                                                                                                         | 43 |
| Figura 11 - Curva de calibração do método fenol sulfúrico.....                                                                                                                                                     | 44 |
| Figura 12 - Rendimento da produção de etanol, em %, em função do<br>tempo de fermentação.....                                                                                                                      | 45 |
| Figura 13 - Dispersão dos valores de rendimento preditos e<br>observados.....                                                                                                                                      | 49 |
| Figura 14 - Superfície de resposta de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e de Levedura para o<br>rendimento da fermentação alcoólica fixando-se o extrato de levedura<br>( $X_1$ ) em $3,5 \text{ g L}^{-1}$ ..... | 49 |
| Figura 15 - Superfície de resposta de extrato de levedura e de Levedura<br>para o rendimento da fermentação alcoólica fixando-se $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$<br>( $X_3$ ) em $0,30 \text{ g L}^{-1}$ .....  | 51 |
| Figura 16 - Superfície de resposta de extrato de levedura e de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$<br>para o rendimento da fermentação alcoólica fixando-se Levedura ( $X_2$ ) em                                   |    |

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6,33 g L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                             | 51 |
| Figura 17 - Rendimento de etanol em função da estabilização do simplex.....                                                                                                                              | 52 |
| Figura 18 - Estabilização do valor da variável independente extrato de levedura, em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica.....                             | 53 |
| Figura 19 - Estabilização do valor da variável independente levedura, em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica.....                                        | 54 |
| Figura 20 - Estabilização do valor da variável independente NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica..... | 54 |
| Figura 21 - Cromatograma após a fermentação alcoólica nas condições ótimas estabelecidas.....                                                                                                            | 55 |
| Figura 22 - Teste qualitativo para presença de etanol (verde) na fermentação do FOS. Fonte: o autor.....                                                                                                 | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Variáveis da fermentação alcoólica exploratória<br>(Da Silva et al., 1987).....                                                                                                     | 44 |
| Tabela 2 – Nível de variação, variáveis independentes codificadas (x),<br>originais (X) e rendimento de álcool (Y) obtido a partir da fermentação<br>do extrato aquoso de polpa de jerivá..... | 47 |
| Tabela 3 – Análise de variância para a produção de álcool obtido a<br>partir do extrato aquoso de polpa de jerivá usando o delineamento<br>fatorial incompleto $3^3$ .....                     | 48 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Equação 1. Coordenada p do simplex inicial.....                                               | 30 |
| Equação 2. Coordenada n do simplex inicial.....                                               | 30 |
| Equação 3. Equação de Nakai Et al.(1984) para $m_1$ no simplex supermodificado.....           | 31 |
| Equação 4. Equação de Nakai Et al.(1984) para $m_2$ no simplex supermodificado.....           | 31 |
| Equação 5. Cálculo do centróide P.....                                                        | 32 |
| Equação 6. Cálculo do vértice de reflexão R.....                                              | 32 |
| Equação 7. Equação do novo simplex gerado por B,N e Z.....                                    | 32 |
| Equação 8. Derivada da equação 6, com a substituição de $\alpha$ .....                        | 33 |
| Equação 9. Determinação do teor de álcool. ....                                               | 40 |
| Equação 10.Determinação do rendimento em porcentagem de etanol obtido.....                    | 41 |
| Equação 11. Equação da regressão do delineamento experimental em função do rendimento(Y)..... | 46 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|           |                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------|
| ANFAVEA   | Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores |
| ATP       | Adenosina trifosfato                                        |
| BNDES     | Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social        |
| CAPES     | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| FOS       | Frutooligossacarídeos                                       |
| G.L.      | Graus de liberdade                                          |
| CLAE      | Cromatografia líquida de alta eficiência                    |
| LPAC      | Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis           |
| MAPA      | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento         |
| MSR       | Metodologia da Superfície de Resposta                       |
| PPGBI     | Programa de Pós Graduação em Bioenergia                     |
| PRÓALCOOL | Programa Nacional do Alcool                                 |
| UNICA     | União da Agroindústria Canavieira de São Paulo              |

## SUMÁRIO

|                                                  |           |
|--------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                        | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>             | <b>18</b> |
| 2.1 Etanol .....                                 | 18        |
| 2.2 Fermentação alcoólica .....                  | 22        |
| 2.3 Levedura .....                               | 23        |
| 2.4 Suplementação do meio.....                   | 24        |
| 2.5 Jerivá: <i>Syagrus romanzoffiana</i> .....   | 25        |
| 2.6 Simplex supermodificado .....                | 28        |
| 2.7 Método da Superfície de Resposta (MSR) ..... | 34        |
| <b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>                     | <b>35</b> |
| <b>4 OBJETIVOS.....</b>                          | <b>36</b> |
| 4.1 Objetivo geral .....                         | 36        |
| 4.2 Objetivos Específicos .....                  | 36        |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                 | <b>37</b> |
| 5.1 Coleta dos frutos .....                      | 37        |
| 5.2 Substrato .....                              | 37        |
| 5.3 Suplementação de Nutrientes .....            | 38        |
| 5.4 Levedura .....                               | 38        |
| 5.5 Fermentação Alcoólica .....                  | 38        |
| 5.6 Análises .....                               | 39        |
| 5.6.1 Cromatografia.....                         | 39        |
| 5.6.2 Determinação de açúcar total.....          | 39        |
| 5.6.3 Determinação do teor de álcool.....        | 39        |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| 5.6.4 Destilação Fracionada.....          | 41        |
| 5.7 Delineamento Experimental .....       | 41        |
| 4.8 Otimização Simplex.....               | 42        |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>      | <b>43</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>                  | <b>57</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>58</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol para ser utilizado como biocombustível tem atraído a atenção de pesquisadores, empresas e governos. Isso decorre das pressões de preços e perspectivas de esgotamento das fontes não renováveis de combustíveis fósseis, assim como de preocupações de natureza ambiental, relacionadas à emissão de substâncias que comprometem o meio ambiente (BASTOS, 2007). Além dos aspectos socioeconômicos, a sua obtenção tem importância reconhecida, sendo o álcool etílico uma fonte renovável de energia, menos poluente integra a matriz energética nacional e é um dos produtos mais importantes do mercado internacional (FERNANDES, 2003; SILVA, 2006).

No Brasil o etanol vem sendo usado como combustível desde a década de 20, mas, foi somente com o advento do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), que seu papel ficou claramente definido em longo prazo, permitindo que o setor privado investisse maciçamente no aumento de produção (LEITE, 2007).

A primeira crise do petróleo de 1973 levou o país a lançar um programa nacional, para substituir parte da gasolina por etanol (AMORIM, 2005). O Proálcool, lançado em 14 de novembro de 1975, propiciou melhorias tecnológicas nas usinas e destilarias, e desenvolvimento da indústria automobilística (RODRIGUES, 2006).

Desde então, a produção de etanol aumentou muito tornando o Brasil o maior produtor, exportador e consumidor de álcool produzido por fermentação (RICHARD, 2006). Além do mais é o único país a introduzir, em larga escala, o álcool como combustível alternativo ao petróleo, e um dos países mais avançados, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível (SILVA, 2006). Exclusivamente no Brasil o etanol não é utilizado somente na mistura gasolina-

etanol, é aplicado também como combustível direto. Para sua obtenção pode se utilizar de diferentes formas de biomassa, sendo a cana de açúcar, no Brasil a principal fonte de geração do combustível.

No Brasil a produção de álcool é feita por fermentação de mosto, constituído por caldo de cana ou melaço, ou ainda, por misturas desses dois componentes. Alguns macronutrientes e/ou micronutrientes também são adicionados ao mosto, a fim de complementar as deficiências do meio, quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras na transformação dos açúcares (STUPIELLO, 1985).

Como uma alternativa para a produção de etanol busca-se diferentes matérias primas que tenham rendimento e viabilidade semelhantes com a de cana de açúcar, entre essas alternativas encontram-se as palmáceas que possuem em seus frutos uma qualidade importante para a produção de etanol, a existência de carboidratos, ou seja, açúcares que possibilitam a fermentação alcoólica. As palmáceas representam uma das maiores famílias de plantas existentes, ocupando quase todos os habitats (DONATTI, 2004).

A palmácea *Syagrus romanzoffiana*, pertence à família *Palmae*, conhecida popularmente como jerivá, seus frutos são semelhantes a um coco, adocicados, que envolvem uma única semente, em sua composição há grande quantidade de óleos e carboidratos (DONATTI, 2004; FLEURY, 2003; LORENZI, 2002, 2004, PIRES, 2006).

Para que o etanol seja produzido é necessário que os açúcares encontrados no extrato aquoso da polpa do jerivá, passem por uma transformação química chamada fermentação alcoólica. E esse processo envolve a ação de microrganismos chamados leveduras, essas por sua vez transformam os principais açúcares existentes no extrato da polpa como sacarose, frutose e glicose em etanol, estando em condições favoráveis, como temperatura e pH ideais. O microrganismo agente

da fermentação mais utilizado é um fungo leveduriforme, a *Saccharomyces cerevisiae* (STUPIELLO, 1985). No processo de produção de etanol vários fatores interferem no rendimento como: a presença de suplementação de nutrientes como nitrogênio fósforo e magnésio, a quantidade de levedura adicionada e as condições de tratamento dessa fermentação alcoólica (CESAR, 1987).

Para encontrar valores ótimos destas variáveis na produção do etanol a partir do extrato aquoso da polpa de jerivá, um método é o da superfície de resposta, que permite desenvolver modelos matemáticos baseados em experiências práticas realizadas, que possibilita uma minimização de custos e melhoria na qualidade dos processos (HILL, 1966).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Etanol

O etanol, no início da produção, era utilizado fundamentalmente na fabricação de bebidas e, numa fase posterior, como insumo em algumas indústrias, como a farmacêutica e a de perfumes. Esse padrão de utilização, muito semelhante ao que vigorava no resto do mundo, era perfeitamente compatível com a produção com base em subprodutos da fabricação do açúcar. O uso do álcool como carburante era inexpressivo e restringia-se a experiências isoladas. (BNDES, 2008).

A produção de cana de açúcar no Brasil é datada em meados século XIV, início período colonial. Já em meados do século XVII, o Brasil tornou-se o maior produtor de açúcar de cana do mundo, na época destinado ao abastecimento da Europa, num ciclo que durou 150 anos. Um novo ciclo surgiu na crise do petróleo da década de 1970 (LACHEFSKY, 2006).

O Programa Nacional do Álcool (Proálcool), lançado em 14 de novembro de 1975, foi beneficiado por incentivos financeiros, possibilitando melhorias tecnológicas em usinas e destilarias, e desenvolvimentos na indústria automobilística (BIODIESELBR, 2011). Por intermédio da Petrobrás, não somente foram instituídos postos para venda de etanol, como também o estabelecimento do preço do produto que era vendido a preço bem mais reduzido do que a gasolina. De 1975/1976 até 1984/1985, a produção de etanol aumentou em 20 vezes (KOHLHEPP, 1983).

O ciclo do Proálcool teve fim no final da década de 80 com uma crise do setor sucroalcooleiro, gerada pelo desabastecimento do mercado nacional que havia sido criado (RODRIGUES, 2006). Pouco mais de dez anos depois do lançamento do

programa, entre 1986 e 1989, mais de 90% dos automóveis fabricados no Brasil eram movidos a álcool hidratado. A produção de etanol atingiu um pico de 12,3 bilhões de litros na safra 1986-87 (BIODIESELBR, 2011). O financiamento público ao programa escasseou a partir de 1987 enquanto o mercado internacional de açúcar teve preços em ascensão. Como resultado ocorreu um forte desabastecimento do biocombustível no final de 1989 (RODRIGUES, 2006). E o etanol hidratado perdeu competitividade perante a gasolina, mas a obrigatoriedade do uso do anidro na mistura com a gasolina e a velha frota de carros a álcool manteve o programa vivo (LEITE, 2007). No final do Programa Proálcool, entretanto, foi mantida a mistura de etanol à gasolina de 20 a 25%, a fim de reduzir as emissões de CO<sub>2</sub>, especialmente nos centros urbanos.

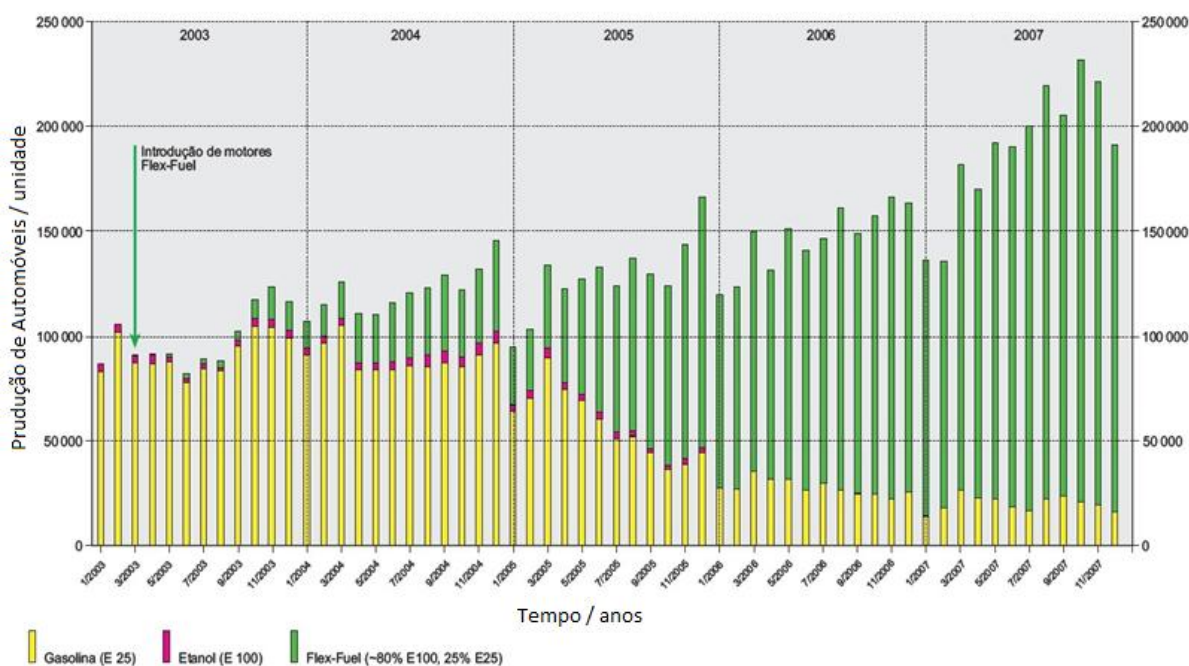
No início da década, com base na discussão mundial sobre a substituição das energias fósseis por energias renováveis, no início desta década e em razão da queda do preço do açúcar no mercado mundial, o Brasil considerou a necessidade da retomada do Programa Proálcool (KOHLHEPP, 2010).

Em 2002 começou uma nova elevação nos preços internacionais do petróleo, e o consequente aumento de preço da gasolina, que trouxe de volta o interesse do consumidor pelo carro a álcool (LEITE E LEAL, 2007). No mesmo ano, foi apresentado o primeiro veículo com motor *flex-fuel*, modelo desenvolvido por empresas alemãs e produzido em série no Brasil a partir de março de 2003. Após quase vinte anos de dificuldades o setor de etanol ingressou em nova etapa com a introdução dos motores flexíveis, trata-se, como o nome indica, de motores que podem operar com misturas de etanol e gasolina em quaisquer proporções. Dessa forma, a demanda por combustíveis dos veículos com esse tipo de motor foi

determinada, no essencial, pela relação de preços entre o etanol e a gasolina (BNDES, 2008; KOHLHEPP, 2010).

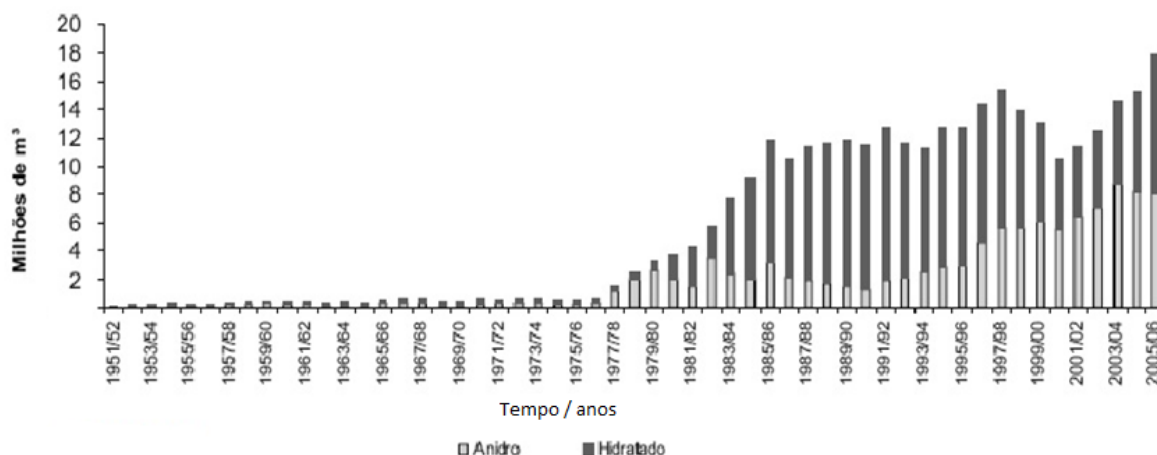
Em decorrência, a frota de automóveis e veículos comerciais leves – de acordo com a classificação da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA) –, com esse tipo de motor, registrou crescimento muito significativo. Em março de 2004, 16% dos veículos novos vendidos no Brasil já eram equipados com esse tipo de motor. Em fevereiro de 2006 já havia 76,6% (XAVIER, 2007), em novembro de 2007, 86,1% (OLIVÉRIO, 2008) e hoje mais de 92% (Figura 1), aumentando assim novamente a produção de etanol (Figura 2).

Figura 1 - Uso de combustível nos carros 0 km no Brasil, 2003-2007. Fonte: ANFAVEA, 2007



A produção de etanol na safra 2010/2011 chegou a 25,13 bilhões de litros, segundo dados divulgados pela União da Indústria da Cana-de-Açúcar (Unica), do volume total, 17,78 bilhões de litros foram de etanol hidratado e 7,35 bilhões de litros de etanol anidro (UNICA, 2012).

Figura 2 - Evolução da Produção Brasileira por Tipo de Álcool. Fonte: MAPA, 2007



Posto lado a lado com o consumo dos derivados de petróleo, o de etanol tem a vantagem de poluir menos e assim colaborar para a redução da emissão dos gases de efeito estufa, entre eles, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Nos primeiros 30 anos, com a substituição de 778 milhões de barris de petróleo, o Proálcool evitou a descarga de 644 milhões de toneladas de  $\text{CO}_2$  na atmosfera, de acordo com números da Petrobras (NOEL, 2007).

O Brasil é o país mais avançado, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível, seguido pelos Estados Unidos e, em menor escala, pela Argentina, Quênia, Malawi e outros. A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros, dos quais se presume que até 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. O Brasil responde por 15 bilhões de litros deste total. O álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, Estados Unidos, União Européia, México, Índia, Argentina, Colômbia e Japão. O etanol é extraído no Brasil da cana-de-açúcar, nos Estados Unidos, do milho. Em outras regiões, como na Europa, é extraído também da beterraba, e da mandioca na Ásia (BIODIESELBR, 2011).

## 2.2 Fermentação alcoólica

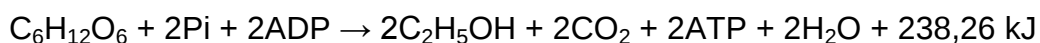
A fermentação alcoólica vem sendo utilizada desde a mais remota antiguidade, há mais de 4.000 anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. No entanto, após um longo período de tempo é que se pôde relacionar a fermentação com as leveduras e fungos amplamente distribuídos na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias (LIMA, 2001).

Entende-se por fermentação, o processo de metabolismo anaeróbico de produção de energia em que os microrganismos oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes, gerando produtos modificados de forma a obter características desejáveis. Integrações altamente coordenadas dessas reações definem as vias metabólicas de utilização do substrato pelos microrganismos. A fermentação alcoólica tem seu início devido à ação das leveduras que usam os açúcares do mosto para seu crescimento e multiplicação, dando como produtos o álcool e anidrido carbônico. Enquanto existe oxigênio no mosto, a levedura cresce e se multiplica. Quando esse acaba começa a produção de álcool e  $\text{CO}_2$  (AQUARONE, 1983).

A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico envolve 11 reações em sequência ordenada conhecida como via glicolítica, onde cada reação é catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas glicolíticas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras. As rotas produtoras de energia geram ATP e coenzimas necessárias para as diversas reações biossintéticas, e intermediários químicos

utilizados como pontos de partida para as diversas reações de biossíntese. Um produto final significativo de todas as rotas é o ácido pirúvico, que em anaerobiose é precursor dos ácidos, álcoois e outros produtos (WARD, 1991).

De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação da reação de Gay-Lussac na qual se observa que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 mols de etanol (92 g), 2 mols de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (88 g) e 238,26 kJ de energia (LEHNINGER et al., 1995; KOLB, 2002).



### 2.3 Levedura

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Fazem parte do grupo de ascomicetos denominados fungos superiores e são unicelulares, eucarióticos e heterotróficos. Em geral são maiores que as bactérias, possuem quase sempre formas arredondadas, ovais ou elípticas; porém variam consideravelmente no que se refere a suas dimensões, com limites desde 1 a 5 µm de largura e 5 a 12 µm de comprimento (PELCZAR et al., 1980).

As leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 26 e 35 °C, com média de 30 °C (LIMA, 1975). Em relação à variação de pH, os limites estão entre 4,5 e 5,5 (NOVAES, 1974).

Os critérios tecnológicos que fazem com que uma levedura seja utilizada comercialmente na fermentação alcoólica são: o alto rendimento e a elevada produtividade, ou seja, rápida conversão de açúcar em álcool, com baixa produção de componentes secundários. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a

*Saccharomyces cerevisiae*, que possui um largo espectro de utilização, sendo empregado na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol, etc (PATARO et al.,1998).

## 2.4 Suplementação do meio

É de suma importância a presença da suplementação no processo fermentativo. Os micronutrientes como enxofre, magnésio, manganês, zinco, cobre, cobalto e outros, têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS, 2004).

Íons metálicos são vitais para todos os organismos (COHEN et al., 2000; NELSON, 1999; STEHLIK-TOMAS et al., 2004), tendo uma função enzimática e estrutural. Alguns íons são o centro catalítico de uma enzima, como um ativador ou estabilizador da função enzimática, entre eles o  $Zn^{2+}$ . A função estrutural é desempenhada pelos íons que agem neutralizando forças eletrostáticas presentes nas muitas unidades celulares aniônicas na maioria das vezes  $Mg^{2+}$  (JONES, 1984).

Zinco, cobre e manganês tem efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GADD; JONES,1990; STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Fósforo, potássio, enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de microrganismos, e estes devem ser suplementados ao meio de cultura (AIBA et al.,1973).

O nitrogênio é um elemento essencial para multiplicação e crescimento das leveduras, como constituinte de várias substâncias orgânicas, como aminoácidos, proteínas, enzimas, purinas, piridinas, vitaminas e outras (WHITE, 1954).

O fósforo absorvido pela levedura tem sua principal função relacionada com a

transferência de energia na célula. Este elemento é considerado indispensável à absorção do carboidrato e a sua posterior conversão em etanol (AMORIM, 1985).

## 2.5 Jerivá: *Syagrus romanzoffiana*

As palmáceas representam uma das maiores famílias de plantas existentes, tanto em riqueza quanto em abundância, ocupando quase todos os habitats. Acredita-se que existam 3500 espécies em 240 gêneros de palmáceas em todo o mundo, sendo amplamente distribuídas em áreas bem drenadas, mas raras em áreas muito secas ou frias. Nos trópicos, existem 550 espécies e 67 gêneros. No Brasil, estão distribuídas 119 espécies, pertencentes a 39 gêneros (DONATTI, 2004; LORENZI, 1996).

Na Mata Atlântica, ocorrem cerca de 40 espécies de palmáceas pertencentes a 10 gêneros, muitas delas endêmicas. Seus frutos constituem-se de grande quantidade de óleos e carboidratos (DONATTI, 2004; FLEURY, 2003; PIRES, 2006).

O gênero *Syagrus* é endêmico da América do Sul, sendo constituído de 42 espécies e oito híbridos naturais. Espalhada em uma vasta região, com uma grande variedade de formas vegetais e climas, apresenta muitas variações morfológicas locais. Ocorre desde o leste da Colômbia até a Guiana Francesa, sul do Uruguai e norte da Argentina, com centro de diversidade entre os estados da Bahia e Minas Gerais, Brasil (ALVES-COSTA, 2004).

A palmácea *Syagrus romanzoffiana*, pertence à família *Palmae*, a espécie foi honrado com o nome do político Nikolai Petrovich Romanoff (1754-1826), que financiou a segunda expedição russa nas Américas, encontra-se em toda a América do Sul, ocorrendo no Brasil desde o sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Goiás até o Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, ainda no Paraguai, na

Argentina e no Uruguai. Ocorre em diversos habitats como florestas subtropicais e de araucárias, Floresta Atlântica, cerrados, estepes e restingas costeiras, em campos sujos e em florestas secundárias jovens, mas também em florestas secundárias tardias e florestas maduras (GUIX, 2000, LORENZI, 2002, 2004).

A *Syagrus romanzoffiana* (Chamisso) Glassman tem como sinônimas botânicas: *Arecastrum romanzoffiana* (Cham.) Becc., *A. romanzoffianum* var. *australe* (Mart.) Becc., *A. romanzoffianum* var. *micropindo* Becc., *A. romanzoffianum* var. *genuinum* Becc., *Cocos acrocomoides* Drude, *C. arechavaletana* Barb. Rodr., *C. australis* Mart., *C. datil* Griseb & Drude, *C. geriba* Bart. Rodr., *C. martiana* Drude & Glaz, *C. plumosa* Hook.F., *C. romanzoffiana* Cham (LORENZI, 1996, 2004).

Conhecido popularmente como jerivá, gerivá, coqueiro gerivá, coqueiro, coco-de-cachorro, baba-de-boi, coco-de-catarro, coco-de-babão, é uma palmácea de 8 a 15 m de altura, com um tronco colunar único, 30 a 50 cm de diâmetro. As folhas alongam-se a 4 metros, de uma cor que vai do verde claro ao escuro (Figura 3), em função das características do solo (LORENZI, 1996, 2004).

A reprodução é sexuada, a germinação das sementes ocorre em um período de seis a oito meses, com potencial germinativo de 50% a 79%. Seu florescimento ocorre de setembro a março e seus frutos de fevereiro a agosto, podendo variar de acordo com o clima de cada região (BERNACCI, 2008). Sendo uma planta de clima tropical tolerante a climas quentes e frios, têm um crescimento rápido e uma resistência para as baixas temperaturas em até -5 °C, podendo ser plantado em mata ciliar, próxima de umidade, em áreas abertas e solo degradado (BERNACCI, 2008).

Figura 3 - Jerivá, *Syagrus romanzoffiana*. Fonte: MAZZA, 2012



O jerivá apresenta inflorescência em cacho pendente, ramificado, de até 150 cm de comprimento, produz uma inflorescência mais curta do que as folhas, com centenas de ráquias (Figura 4a). Seus frutos do tipo drupa são globosos ou ovóides, de cor amarela ou alaranjada, com um fino exocarpo e um mesocarpo fibroso, suculento e adocicado que envolve uma única semente (Figura 4b). A produtividade é de 500 kg a 1.200 kg/ha ao ano onde um quilo de frutos contém cerca de 140 unidades (ASHWATH, 2010; LORENZI, 2002, 2004, 2010).

Segundo Jorge e Coimbra (2011), pesquisas mostraram um alto valor de carboidratos na polpa do fruto do jerivá chegando a um valor aproximadamente de 49% sendo que algumas variações de rendimento podem ocorrer devido às condições de localização e clima de cada região.

Figura 4 - (a) Floração do Jerivá, (b) Frutos maduros, *Syagrus romanzoffiana*. Fonte: MAZZA, 2012; SANTANA, 2011



(a)



(b)

## 2.6 Simplex supermodificado

O desenvolvimento de novos produtos, além de considerações técnicas, legais e mercadológicas, requer processos de otimização que possam buscar melhores condições de processamento e formulação, com alta qualidade e baixo custo. No decorrer dos anos, vários métodos de otimização foram desenvolvidos (BONA, 2000).

A otimização de sistemas é um processo de ajuste para os fatores que os influenciam na tentativa de produzir o melhor resultado (resposta). Os métodos de otimização, segundo Burton e Nickless (1987) (*apud* EIRAS, 1996), surgiram com a necessidade de se descrever em termos matemáticos ou regras a complexidade dos sistemas que ocorrem na prática. Muitos desses processos práticos são

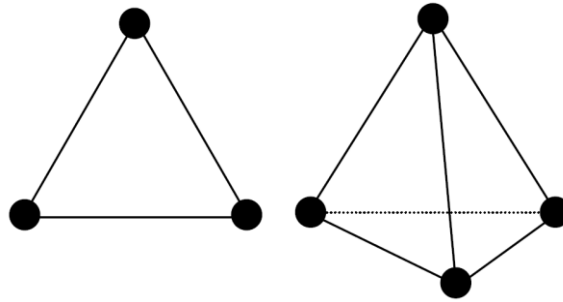
influenciados por mais de um fator e tenta-se buscar uma combinação de fatores que otimize o sistema ou conduza a uma melhor resposta (MORGAN et al., 1990). Porém o sucesso de um método de otimização depende da sua eficácia para encontrar o ótimo corretamente (HEDLUND, 1999). Os processos de otimização são divididos em etapas, caracterizadas por decisões sobre a função a ser observada, pela determinação dos fatores que influenciam significativamente a resposta e, por fim, pela otimização propriamente dita das variáveis selecionadas (EIRAS, 1996).

Uma proposta inovadora, conhecida por simplex, foi apresentada por Spendley (1962). O simplex é uma figura regular que se desloca sobre uma superfície, de modo a evitar regiões de resposta não satisfatória. No espaço  $n$ -dimensional o simplex é um poliedro com faces planas contendo  $n+1$  vértices, onde  $n$  é o número de variáveis (contínuas ou discretas) independentes. O método é um procedimento recorrente, que tende a levar o simplex a um valor ótimo através da reflexão de pontos específicos. Uma vez nas vizinhanças do ótimo, o simplex pode sofrer contração com o objetivo de determinar uma posição mais precisa (BEVERIDGE, 1987). O simplex é de fácil implantação nos processos automatizados. Sua aplicação é relativamente fácil e rápida, e permite, com boa margem de segurança, localizar a região ótima, apesar de não oferecer informações claras com respeito ao comportamento das variáveis (EIRAS, 1996). Segundo Nakai (1984), a otimização simplex é um procedimento automatizável para planejamentos experimentais sequenciais. Uma vez estabelecidos os parâmetros para a condição inicial, novas sequências experimentais são sugeridas pelo algoritmo. Assim, todos os experimentos podem ser orientados automaticamente em direção ao ótimo (BONA, 2000).

O princípio do simplex básico, descrito por Spendley (1962), foi deslocar uma

figura regular, por exemplo um triângulo equilátero sobre uma superfície, quando duas variáveis (fatores) estavam sendo consideradas (Figura 5).

Figura 5 - Interpretação geométrica do simplex para duas e três variáveis. Fonte: BONA, 2000



Nelder e Mead (1965) propuseram o simplex modificado, que nada mais é do que o simplex básico, alterado em seu tamanho e forma, para adaptar-se melhor à superfície de resposta.

Segundo o método descrito por Pires et al. (1998) inicia-se a otimização (maximização ou minimização) atribuindo-se limites inferiores ( $L_i$ ) e superiores ( $U_i$ ) para cada fator que será controlado. Os níveis inferiores são escolhidos como primeiro vértice. Spendley et al. (1962) apresentaram uma técnica que permite calcular as demais coordenadas do simplex inicial segundo as expressões 1 e 2, onde  $n$  é o número de variáveis (contínuas ou qualitativas) e  $t$  a distância entre dois vértices (geralmente tomada como 1).

$$p = \frac{t}{n\sqrt{2}} (\sqrt{n+1} + n - 1) \quad (1)$$

$$q = \frac{t}{n\sqrt{2}} (\sqrt{n+1} - 1) \quad (2)$$

Nakai et al. (1984) adicionaram ao simplex, denominado supermodificado, os limites inferiores e superiores dos fatores utilizados nas expressões 3 e 4.

$$m_1 = L_i + p(U_i - L_i) \quad (3)$$

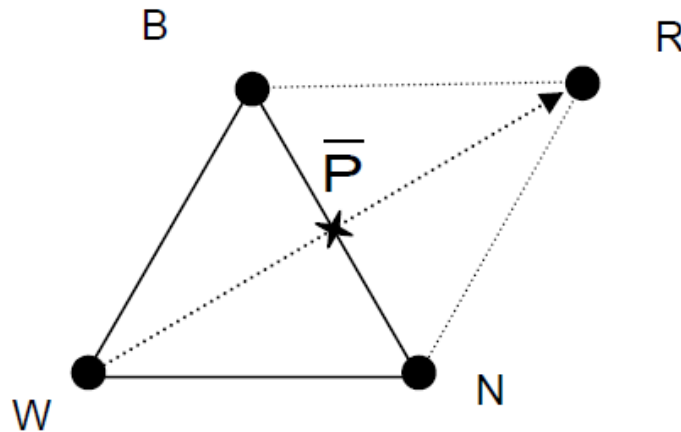
$$m_2 = L_i + q(U_i - L_i) \quad (4)$$

A partir da geometria analítica pode-se determinar que as coordenadas dos vértices de um simplex regular são representadas pela matriz **M**, na qual as colunas representam os componentes dos vértices, numerados de 1 até n+1 e as linhas representam as coordenadas, i = 1 até **n** (HIMMELBLAU, 1972).

$$M = \begin{vmatrix} L_i & m_1 & m_2 & m_2 \\ L_i & m_2 & m_1 & m_2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ L_i & m_2 & m_2 & m_1 \end{vmatrix} \text{matriz } n \times (n+1)$$

Após estabelecido o simplex inicial, o sistema estudado deve ser avaliado nas condições propostas pelo método. Através das repostas obtidas, os vértices são classificados em **B** (melhor), **N** (intermediários) e **W** (pior). O novo simplex será determinado rejeitando-se o vértice correspondente à pior resposta e substituindo-se esse vértice pela sua reflexão (**R**) na hiperface definida pelos vértices restantes. A direção do movimento de reflexão (Figura 6) é determinada pelo centróide (**P**) formado pelos pontos remanescentes (SPENDLEY et al., 1962).

Figura 6 - Movimento de reflexão em um simplex para duas variáveis. Fonte: BONA, 2000



O centróide pode ser calculado pela equação 5. Segundo Himmelblau (1972), a equação 6, onde  $\alpha$  é o coeficiente de reflexão, determina o vértice de reflexão para o caso de duas variáveis. Este coeficiente nada mais é do que um múltiplo ou submúltiplo do segmento de reta que une o centróide a **W**. Nelder e Mead (1965) demonstraram ser necessário um número menor de iterações para otimizar um problema quando  $\alpha = 1$ .

$$\bar{P} = \frac{B + N}{2} \quad (5)$$

$$R = \bar{P} + \alpha(\bar{P} - W) \quad (6)$$

Para evitar uma expansão ou contração muito rápida do simplex, que poderia afastá-lo do ponto ótimo, é gerado um vetor de movimento em direção ao ótimo (vetor movimento). Este procedimento gera um valor em um ponto intermediário ao valor da próxima reflexão. O novo simplex será formado pelos vértices **B**, **N** e **Z** conforme a equação 7. Onde  $\beta$  é um fator de expansão ( $\beta = \alpha + 1$ ) e  $\beta_{opt}$  é o seu valor ótimo correspondente (BARROS NETO et al., 1995).

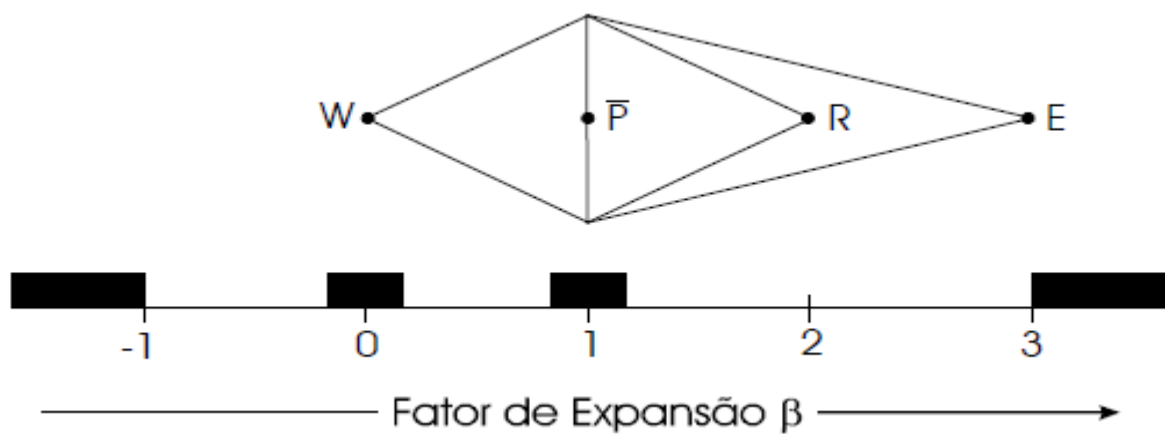
$$Z = \beta_{opt} \bar{P} + (1 - \beta_{opt})W \quad (7)$$

Este valor pode ser obtido substituindo-se  $\alpha$  na equação 6, derivando-se posteriormente. O resultado obtido é idêntico à equação 8.

$$\beta_{\text{opt}} = \left[ \frac{R_W - R_{\bar{P}}}{R_R - 2R_{\bar{P}} + R_W} \right] + 0,5 \quad (8)$$

Os valores de  $R_W$ ,  $R_{\bar{P}}$  e  $R_R$  são as respostas determinadas nos pontos **W**, **P** e **R**, respectivamente. Infinitos valores são possíveis para  $\beta_{\text{opt}}$ . Algumas faixas de valores, no entanto, são inconvenientes (Figura 7). Os valores de  $\beta_{\text{opt}}$  inferiores a  $-1$  ou superiores a  $3$  representam extrapolações excessivas do simplex. Valores de  $\beta_{\text{opt}}$  próximos de zero devem ser evitados, porque resultariam num novo simplex muito parecido com o original. Se o valor de  $\beta_{\text{opt}}$  for igual a  $1$  o simplex perde uma dimensão. O novo ponto **Z** da equação 7 coincide com o ponto do centróide, e a reflexão não pode ser efetuada. Caso o valor de  $\beta_{\text{opt}}$  caia numa dessas faixas ele é descartado e o novo vértice passa a ser definido por uma série de regras de decisão (Barros Neto et al., 1995).

Figura 7 - Intervalos proibidos para os valores de  $\beta$ . Fonte: BARROS NETO et al., 1995



## 2.7 Método da Superfície de Resposta (MSR)

As técnicas de superfície de resposta são ferramentas matemáticas muito úteis quando se interessa na otimização de um processo em que se têm a influência de vários fatores em uma variável resposta, ou seja, os modelos de superfície de resposta podem ser explorados para determinar condições ótimas para se trabalhar ou a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis dos fatores de interesse.

Encontrar uma solução ótima para um problema de processamento, através de seleção de um conjunto de fatores potencialmente importantes, nas várias etapas do processo, é tarefa difícil e exige um grande número de ensaios experimentais. Para aumentar a eficiência na busca da solução ótima de tais problemas, várias técnicas são utilizadas, sendo importante destacar os planejamentos multifatoriais (BORSATO, 1983). Entre esses a MSR, que tem sido empregada por um número expressivo de pesquisadores (AGUIRRE-GANZÁLES, 2011; BARBOSA et al., 2010; CORDENUNSI et al., 1985; PAULY et al., 2010).

A MSR utiliza delineamentos especiais, calcula equações de segunda ordem ajustando seus coeficientes e testando sua significância, variabilidade e confiabilidade (HENIKA, 1972).

Basicamente, as diretrizes para se trabalhar com um modelo de superfície de resposta são, amostragem, onde se define o número de ensaios a ser executados, já pensando nos modelos que iremos implementar, a modelagem, onde se ajusta os modelos e analisa-se os ajustes obtidos e a otimização, onde se obtém a configuração ótima dos níveis dos fatores de interesse, entre os intervalos considerados, e verifica-se a necessidade de realizar novamente o experimento considerando novos níveis para os fatores. (BARROS NETO, 2010).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Com o aumento da procura por geração de energia limpa e que possa não competir com a cadeia alimentar, é necessário o estudo de outras matérias primas alternativas para a produção de etanol, mas não só para a produção em larga escala, também para uma agricultura familiar, e atender um consumo local.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de etanol obtido do extrato aquoso da polpa de jerivá, em fermentação alcoólica descontínua, combinando a metodologia de superfície de resposta com o método simplex supermodificado

### 4.2 Objetivos Específicos

Estudar as variáveis levedura e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e extrato de levedura, em fermentação alcoólica descontínua, na otimização da produção de etanol obtido do extrato aquoso da polpa de jerivá, combinando a metodologia de superfície de resposta com o método simplex supermodificado

Explorar o potencial da metodologia de superfície de resposta (MSR) para a aplicação no processo de fermentação alcoólica, através de uma análise crítica buscando determinar seus usos mais apropriados.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleta dos frutos

Os frutos foram coletados em Ponta Grossa, na Região dos Campos Gerais do Paraná. As duas plantas utilizadas estão localizadas em 22° 5590487/UTM 7224817 – altitude 909 metros e 22° 5590444/UTM – altitude 915 metros. O clima da região, segundo a classificação climática de Köppen, é temperado propriamente dito (Cfb), com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22 °C e sem estação seca definida (CAVIGLIONE, 2000). Depois de coletados, os frutos foram separados das ramas, lavados com água corrente e secos ao sol por 6 horas com temperatura média de 30 °C, para retirar o excesso de umidade. Após a secagem os frutos foram despulpados em despulpador com uma hélice acionada por motor de 0,55 kW, simulando um liquidificador de baixa rotação, com capacidade para processar 10 kg de frutos misturados com 10 kg de água por batelada. Posteriormente foram separados fisicamente, com o auxílio de uma peneira, a polpa da fibra e do endocarpo e semente.

### 5.2 Substrato

Foi utilizado o extrato aquoso da polpa do jerivá. Sendo o pH do mesmo igual 4,8, e feita uma filtração simples em tecido filtrante de algodão.

### 5.3 Suplementação de Nutrientes

Foram adicionados em todo o meio de cultura, extrato de levedura nas concentrações de 1,5, 2,5 e 3,5 g L<sup>-1</sup>. Nitrogênio e fósforo na forma de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (CRUZ, 1980), nas concentrações de 0,3, 0,35 e 0,4 g L<sup>-1</sup>, magnésio como MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,25 g L<sup>-1</sup>) e zinco como ZnSO<sub>4</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>).

### 5.4 Levedura

Blocos de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (ITAIQUARA), foram deixados em equilíbrio, em temperatura ambiente por uma hora. A camada externa dos blocos foi descartada por possibilidade de contaminação (JONES, 1981). A levedura estabilizada foi adicionada ao meio de cultura, em quantidades correspondentes a 2, 6 e 10 g L<sup>-1</sup>.

### 5.5 Fermentação Alcoólica

Foram utilizados Erlenmeyers (125ml) pré-esterilizados contendo meio de cultura suplementado. A fermentação foi com 2, 6 e 10 g L<sup>-1</sup> de levedura inoculada. Os erlenmeyers foram fechados com algodão hidrofóbico e incubados por 8 horas em temperatura de 30 °C estabilizada em estufa. Após a centrifugação e interrupção da fermentação foi medido o teor de álcool.

## 5.6 Análises

### 5.6.1 Cromatografia

Análise cromatográfica realizada com HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) da marca SHIMATZU, bomba LC-10AD, forno CTO-10A, detector de índice de refração RID-10A e integrador C-R6A, em fluxo de  $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , forno na temperatura de  $80^\circ\text{C}$  e pressão de 48 atm, a coluna para carboidratos utilizada foi AMINEX HPX 87C (300mm x 7,8mm) sendo a fase móvel água ultra pura MILLI-Q. Padrões de glicose, sacarose, frutose e frutooligossacarídeos (FOS).

### 5.6.2 Determinação de açúcar total

Para a determinação de açúcar total utilizou o método do Fenol sulfúrico onde o ácido sulfúrico concentrado desidrata pentoses e hexoses convertendo em furfural e hidroximetilfurfural respectivamente, os quais reagem com fenol formando um complexo colorido de coloração alaranjada (DUBOIS et al, 1956).

### 5.6.3 Determinação do teor de álcool

O teor de álcool foi determinado pelo método de ZIMMERMAN (1970) usando dicromato. Uma alíquota de 1 mL do fermentado foi destilado em um microdestilador TE-012 Tecnal (Figura 8). O etanol é oxidado a ácido acético quando reage com dicromato de potássio (0,075 M) em meio sulfúrico a quente. O excesso de dicromato é titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal, na presença do indicador ortofenantrolina. O teor de álcool ou a produção de álcool foi calculado em

$\text{g L}^{-1}$ , utilizando a equação 9, e para cálculo do rendimento utilizou a equação 10.

Figura 8 - Microdestilador, marca - TE-012. Fonte: o autor



$$E (\text{g L}^{-1}) = k \cdot V_{\text{reagente}} \cdot M_{\text{reagente}} \cdot (1 - V_{\text{amostra}} / V_{\text{branco}}) \quad (9)$$

onde,  $E (\text{g L}^{-1})$  = Teor de álcool,  $k = 11,5$  (constante teórica);  $V_{\text{reagente}}$  = volume dicromato de potássio;  $M_{\text{reagente}}$  = Molaridade dicromato de potássio;  $V_{\text{amostra}}$  = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra;  $V_{\text{branco}}$  = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco.

$$\% = (\text{Teor de álcool obtido (g L}^{-1}\text{)} \times 100) / \text{Teor de álcool máximo (g L}^{-1}\text{)} \quad (10)$$

onde, teor de álcool máximo (g L<sup>-1</sup>) é em relação ao valor de açúcar previamente determinado.

#### 5.6.4 Destilação Fracionada

O processo de concentração do etanol consiste em uma coluna de Vigreux com 60 cm de comprimento, que acoplada com um balão sobre uma manta de aquecimento, um termômetro, para controlar a temperatura de evaporação do etanol e um condensador (Figura 9).

#### 5.7 Delineamento Experimental

Para otimizar as condições de fermentação alcoólica do extrato aquoso de jerivá foi utilizado o delineamento fatorial incompleto de Box-Behnken (3<sup>3</sup>). Cada variável independente (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>) foi transformada respectivamente em variável codificada (x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> e x<sub>3</sub>). Foram realizados, 13 experimentos entre estes o ponto central que foi repetido 2 vezes resultando um total de 15 experimentos. As variáveis independentes, extrato de levedura (X<sub>1</sub>), levedura (X<sub>2</sub>) e NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (X<sub>3</sub>) foram analisadas em três níveis equidistantes de variação e codificadas com -1, 0 e +1 sendo que o rendimento da reação foi escolhido como variável de resposta (Y) (STATISTICA 7, 2009).

Figura 9 - Destilação fracionada com coluna de Vigreux. Fonte: o autor



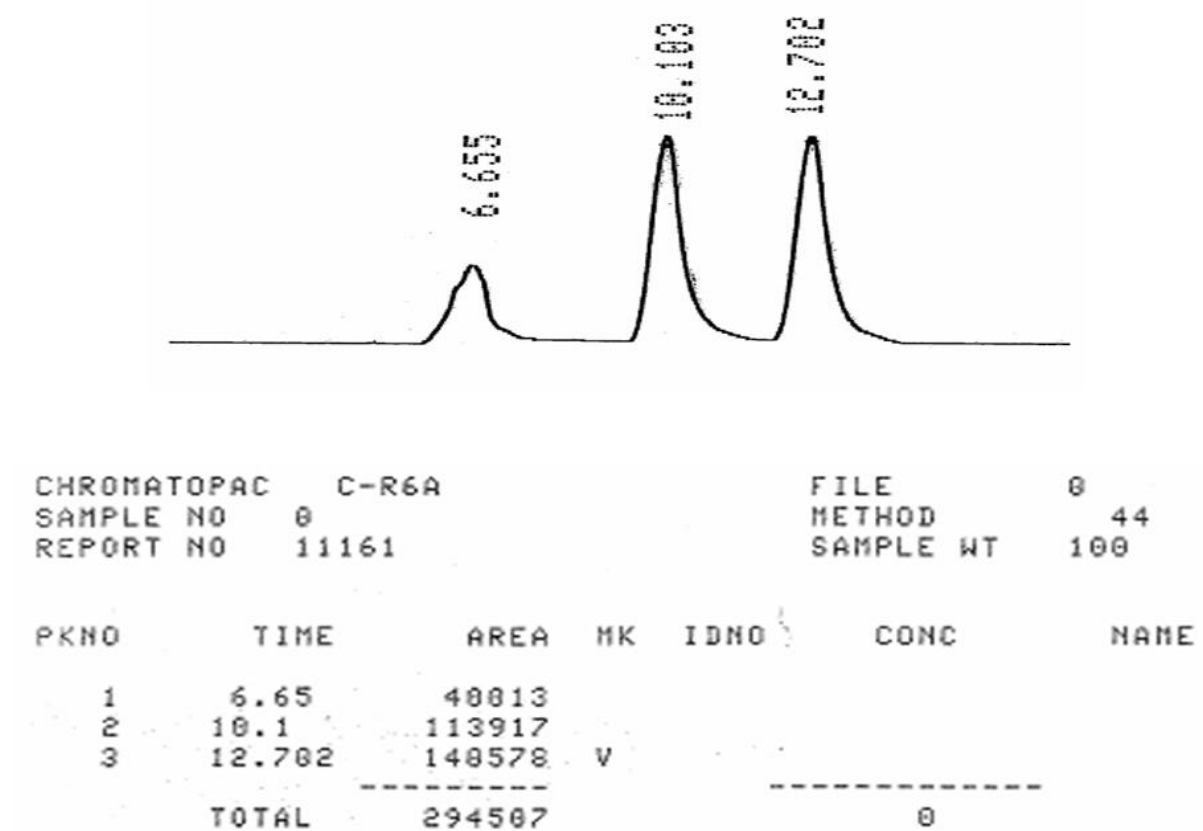
#### 4.8 Otimização Simplex

A otimização foi realizada combinando a equação de regressão oriunda da metodologia de superfície de resposta com o método simplex super-modificado (BONA et al., 2000).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

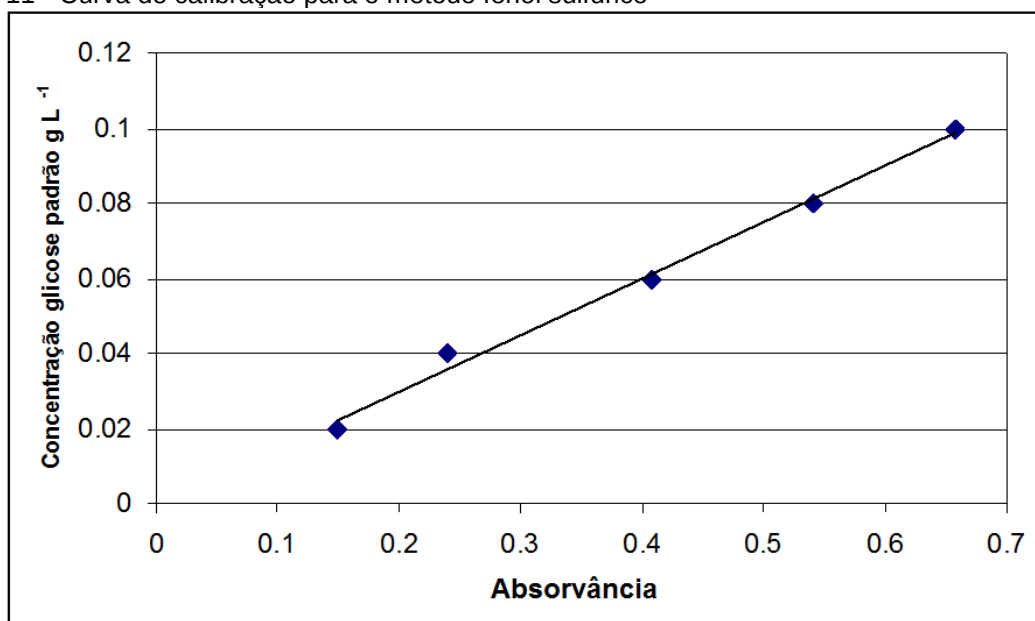
Após a remoção da polpa do fruto, e uma filtração retirando as fibras existentes no suco, realizou-se uma análise cromatográfica do extrato aquoso da polpa do jerivá antes da fermentação alcoólica que apresentou glicose, frutose e frutooligossacarídeos (FOS) como fonte de carboidratos, e também a ausência de sacarose antes da fermentação alcoólica (Figura 10). Os tempos de retenção foram de 6,65 minutos para o FOS, 10,103 para frutose e 12,702 para glicose. A soma das áreas, fazendo as concentrações relativas ao padrão, apresentou 30,7 g L<sup>-1</sup> de glicose, 22,0 g L<sup>-1</sup> de frutose e 7,3 g L<sup>-1</sup> de FOS.

Figura 10 - Cromatograma extrato da polpa de jerivá antes da fermentação alcoólica



Através da curva de calibração para o método fenol sulfúrico (Figura 11), que apresentou um fator de calibração de 0,138 e  $R^2$  igual a 0,9936, foi determinada a quantidade de açúcar total presente no suco da polpa de jervá, sendo que este apresentou uma quantidade igual a  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

Figura 11 - Curva de calibração para o método fenol sulfúrico



Uma fermentação exploratória foi realizada para que fosse possível encontrar os pontos de mínimo e máximo das variáveis a serem utilizados no delineamento experimental.

Silva et al. (1987) utilizou as variáveis: extrato de levedura, levedura  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , para uma fermentação alcoólica em meio sintético, sendo inicialmente empregada no presente trabalho (Tabela 1).

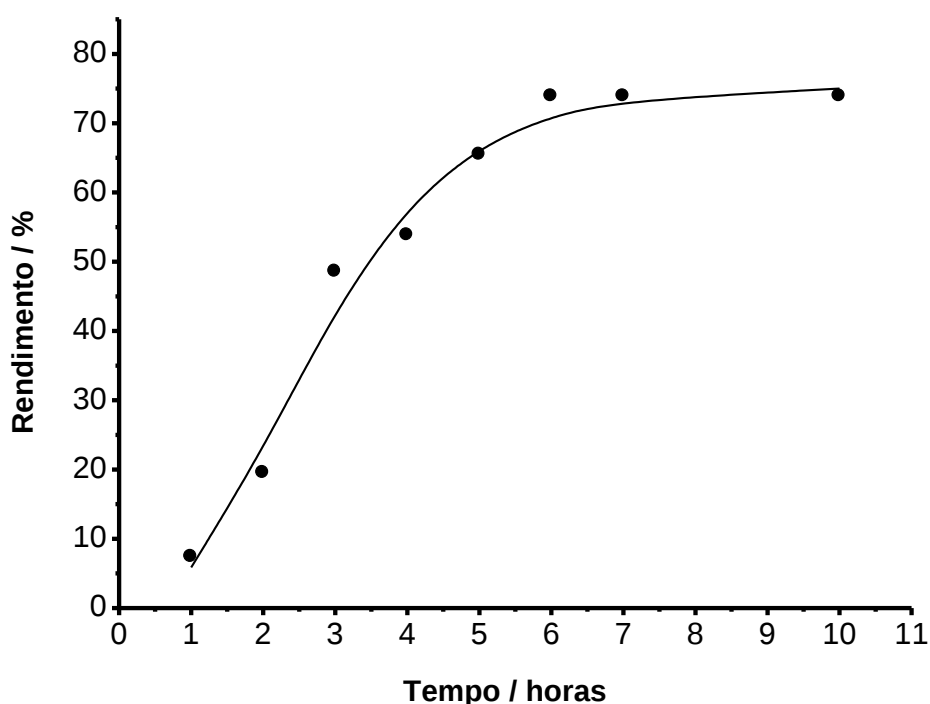
Tabela 1 - Variáveis da fermentação alcoólica exploratória. Fonte: SILVA et al., 1987

| Variáveis                          | Concentração $\text{g L}^{-1}$ |
|------------------------------------|--------------------------------|
| Extrato de levedura                | 24,0                           |
| Levedura                           | 80,0                           |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ | 2,0                            |

As concentrações das variáveis utilizadas foram de quantidades inadequadas para o suco do Jerivá, principalmente a variável levedura. Chegando ao pico da produção de etanol em um período de tempo muito curto, sendo que em 3 horas a levedura havia consumido toda a sua fonte de carboidrato. A partir destas informações iniciais encontradas, estabeleceu-se um novo ponto para a fermentação alcoólica do suco. A região experimental, ou seja, os limites superiores e inferiores, de cada uma das variáveis independentes foram escolhidos por estes ensaios preliminares e com base em dados da literatura (CORDENUNSI et al, 1985; SILVA et al, 2008).

Foram executados ensaios para determinar o tempo de fermentação com o extrato da polpa de jerivá contendo  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  de levedura,  $0,35 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , sendo este o ponto central do delineamento estabelecido, e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,25 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{ZnSO}_4$  ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ). A Figura 12 mostra aumento progressivo do rendimento da produção de álcool e a estabilização dos valores das respostas após 6 horas de fermentação.

Figura 12 - Rendimento da produção de etanol, em %, em função do tempo de fermentação



Para otimizar as condições de fermentação alcoólica do extrato da polpa de jerivá foi empregada a metodologia de superfície de resposta (MSR) utilizando o delineamento fatorial  $3^3$  incompleto. O delineamento foi composto por 15 ensaios, com 2 repetições no ponto central para estimar a variância do erro (CALADO, 2003).

O extrato aquoso obtido apresentou pH de 4,8, sendo que, para um crescimento ótimo da levedura em relação à variação de pH, os limites estão entre 4,5 e 5,5 (NOVAES, 1974). Quanto ao ambiente, as leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 26 e 35 °C, com média de 30 °C (LIMA, 1975). Tendo como base essa informação, a temperatura utilizada nos ensaios foi de 30 °C e, o tempo de fermentação utilizado foi de 8 horas e teve como base os dados obtidos na Figura 12.

A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes codificadas, os níveis de variação em valores originais e as respostas dos rendimentos, expressas em valores médios de duas repetições dos ensaios de fermentação empregados.

O modelo quadrático ajustado para o rendimento da fermentação alcoólica, contendo as variáveis independentes codificadas, está representado pela equação 11, onde os coeficientes de regressão foram obtidos por  $\beta = (A'A)^{-1} A'B$ , onde A é a matriz de delineamento contendo os termos lineares, quadráticos e de interação e B é o vetor resposta.

$$Y = 73,53 - 1,99x_2 - 2,8x_3 + 4,0x_1^2 - 15,84x_2^2 - 4,57x_3^2 + 7,00x_1x_2 - 8,92x_1x_3 + 2,43x_2x_3 \quad (11)$$

Tabela 2 – Nível de variação, variáveis independentes codificadas (x), originais (X) e rendimento de álcool (Y) obtido a partir da fermentação do extrato aquoso de polpa de jerivá

| Experimentos | Variáveis codificadas |                |                | Rendimento (%)<br>Y |
|--------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|
|              | x <sub>1</sub>        | x <sub>2</sub> | x <sub>3</sub> |                     |
| 1            | -1                    | -1             | 0              | 72,3                |
| 2            | 1                     | -1             | 0              | 53,2                |
| 3            | -1                    | 1              | 0              | 56,2                |
| 4            | 1                     | 1              | 0              | 65,1                |
| 5            | -1                    | 0              | -1             | 62,0                |
| 6            | 1                     | 0              | -1             | 87,1                |
| 7            | -1                    | 0              | 1              | 76,7                |
| 8            | 1                     | 0              | 1              | 66,1                |
| 9            | 0                     | -1             | -1             | 62,5                |
| 10           | 0                     | 1              | -1             | 51,8                |
| 11           | 0                     | -1             | 1              | 49,6                |
| 12           | 0                     | 1              | 1              | 48,6                |
| 13           | 0                     | 0              | 0              | 73,0                |
| 14           | 0                     | 0              | 0              | 74,9                |
| 15           | 0                     | 0              | 0              | 72,7                |

| Variáveis<br>Independentes                                                           | Níveis Codificados |      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------|------|
|                                                                                      | -1                 | 0    | 1    |
| X <sub>1</sub> =Extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )                             | 1,5                | 2,5  | 3,5  |
| X <sub>2</sub> = Levedura (g L <sup>-1</sup> )                                       | 2,0                | 6,0  | 10,0 |
| X <sub>3</sub> = NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> ) | 0,3                | 0,35 | 0,4  |

Na equação, Y representa a estimativa do rendimento da reação e, na forma codificada, x<sub>1</sub> representa a concentração de extrato de levedura, x<sub>2</sub> a concentração de levedura e x<sub>3</sub> a concentração de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. No modelo completo, apenas o termo linear do extrato de levedura (p= 33,06%) foi não significativo em nível de 5% e, por isso, retirado da equação.

A análise de variância (Tabela 3), sem o termo linear da concentração do extrato de levedura, mostra que o modelo proposto foi significativo em nível de 5% e o desvio não significativo no mesmo nível de variação.

Tabela 3 - Análise de variância para a produção de álcool obtido a partir do extrato aquoso de polpa de jerivá usando o delineamento fatorial incompleto  $3^3$

| Fonte de variação | G.L. | Soma dos quadrados | Quadrado médio | F <sub>calculado</sub> | F <sub>tabelado</sub> |
|-------------------|------|--------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão         | 8    | 1695,314           | 211,9143       | 148,87*                | 19,37                 |
| Linear            | 2    | 94,321             | 47,1605        | 33,13*                 | 19,00                 |
| Quadrática        | 3    | 1062,94            | 354,3133       | 248,90*                | 19,16                 |
| Interação         | 3    | 538,146            | 179,382        | 126,01*                | 19,16                 |
| Desvio            | 4    | 97,609             | 24,4022        | 17,14 <sup>(NS)</sup>  | 19,25                 |
| Erro              | 2    | 2,847              | 1,4235         |                        |                       |
| Total             | 14   | 1795,912           |                |                        |                       |

\* Significativo em nível de 5%. <sup>(NS)</sup> Não significativo em nível de 5%

O valor do coeficiente total de determinação observado ( $R^2$ ) e da porcentagem de variância explicada pelo modelo foram, respectivamente, de 94,59% e 85,0%, que podem ser considerados adequados, pois, de acordo com Joglekar e May (1987), para se obter um bom ajuste do modelo aos dados experimentais o valor do  $R^2$  deve ser superior a 80%. Portanto, o desvio da regressão não significativo e o alto valor do  $R^2$  mostram que a equação obtida, sem o termo linear da concentração do extrato de levedura, pode ser utilizada para fins preditivos sendo adequada para os procedimentos de otimização, podendo ser verificada nos valores de rendimento preditos e nos valores observados experimentalmente (Figura 13).

A superfície de resposta da região de combinação binária entre as variáveis originais teor de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) e de Levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ) pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 14. A figura obtida pelo software Statistica 7<sup>®</sup> mostra as regiões de contorno da superfície de resposta para a variável dependente, rendimento da produção de álcool, obtidas pelo modelo matemático, fixando-se a variável estatisticamente menos importante  $X_1$  em  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ . Com base na Figura 14 observa-se que a região ótima, para o rendimento da produção de etanol, situa-se próxima ao ponto mínimo para a variável  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e no ponto central para a concentração de levedura, fornecendo como resposta ótima estimada um rendimento de etanol superior a 85%.

Figura 13. Dispersão dos valores de rendimento preditos e observados

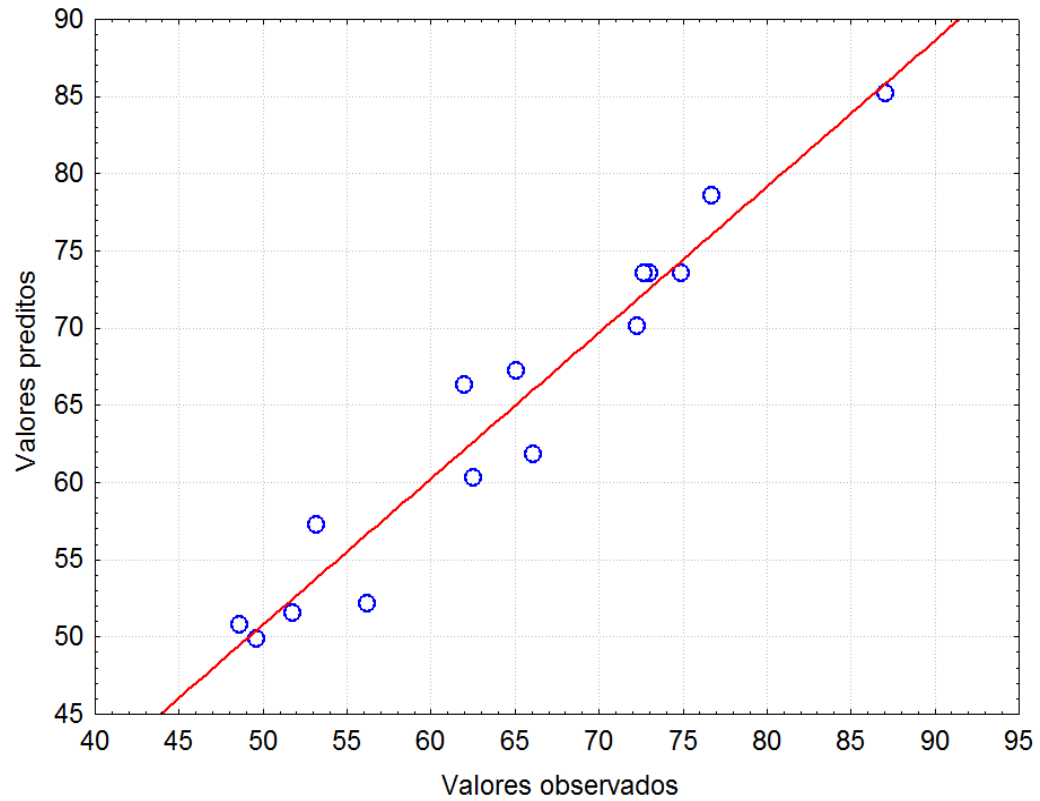
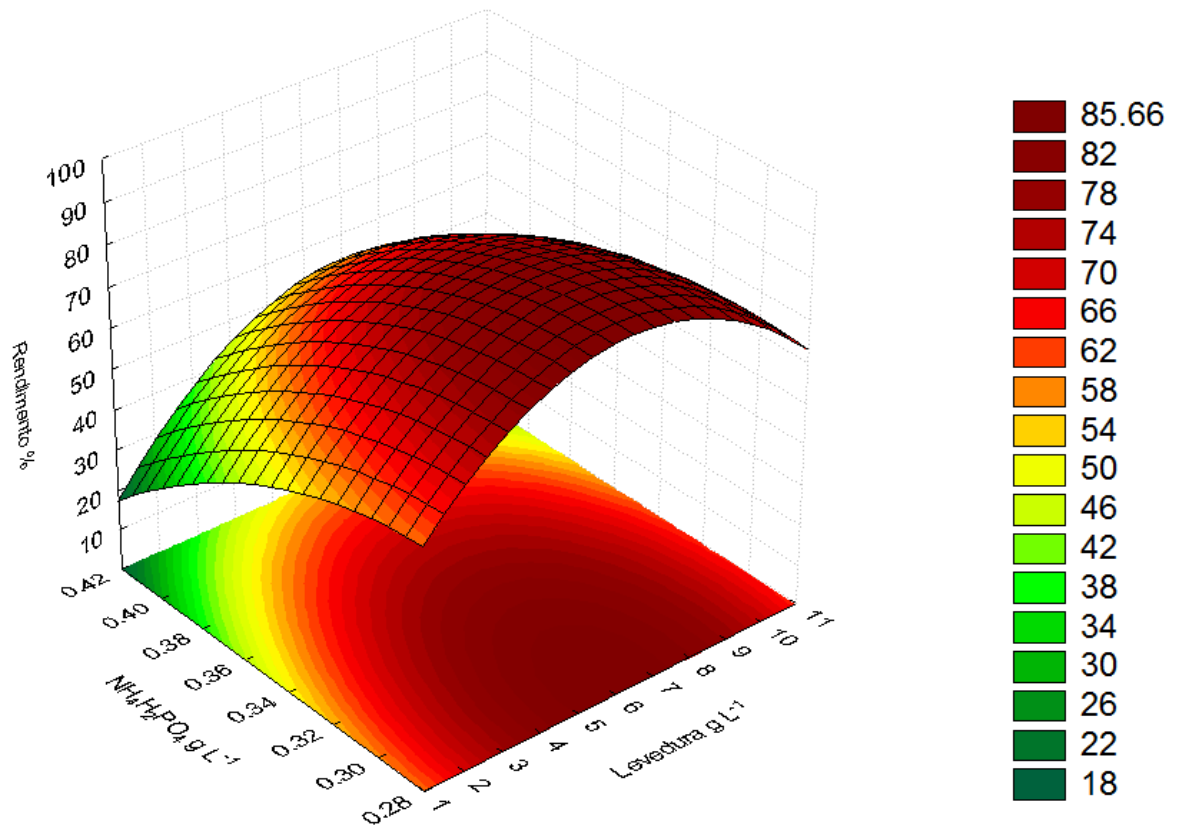


Figura 14 - Superfície de resposta de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e de Levedura para o rendimento da fermentação alcoólica fixando-se o extrato de levedura ( $X_1$ ) em  $3,5 \text{ g L}^{-1}$



A região de combinação binária entre as variáveis originais de extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ) e de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ) pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 15. A figura mostra as regiões de contorno da superfície de resposta para a variável dependente, rendimento da produção de álcool, obtidas pelo modelo matemático, fixando-se a variável  $X_3$  em  $0,30 \text{ g L}^{-1}$ . Com base na Figura 15, observa-se que a região ótima, para o rendimento da produção de etanol, situa-se próxima ao ponto máximo para a variável extrato de levedura e no ponto central para a concentração de levedura, fornecendo como resposta ótima estimada um rendimento de etanol superior a 85%.

A região de combinação binária entre as variáveis originais de extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ) e de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $\text{g L}^{-1}$ ), fixando-se a variável levedura ( $X_2$ ) em  $6,33 \text{ g L}^{-1}$ , pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 16. A figura mostra as regiões de contorno da superfície de resposta para a variável dependente, rendimento da produção de álcool, obtidas pelo modelo matemático. Com base na Figura 16, não se consegue observar uma única região ótima para o rendimento da produção de etanol, pois a curvatura não se apresenta completa, mas, baseando-se nas outras superfícies de resposta anteriores, nota-se que esta região está se direcionando próxima ao ponto máximo para a variável de extrato de levedura e no ponto mínimo para a concentração de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , fornecendo como resposta ótima estimada um rendimento de etanol superior a 85%.

A equação preditiva (equação 11) foi otimizada utilizando o método simplex sequencial (BONA et al., 2000). Os limites superiores e inferiores aplicados na otimização simplex foram os mesmos utilizados pelo delineamento experimental (Tabela 2).

Figura 15 - Superfície de resposta de extrato de levedura e de Levedura para o rendimento da fermentação alcoólica fixando-se  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $X_3$ ) em  $0,30 \text{ g L}^{-1}$

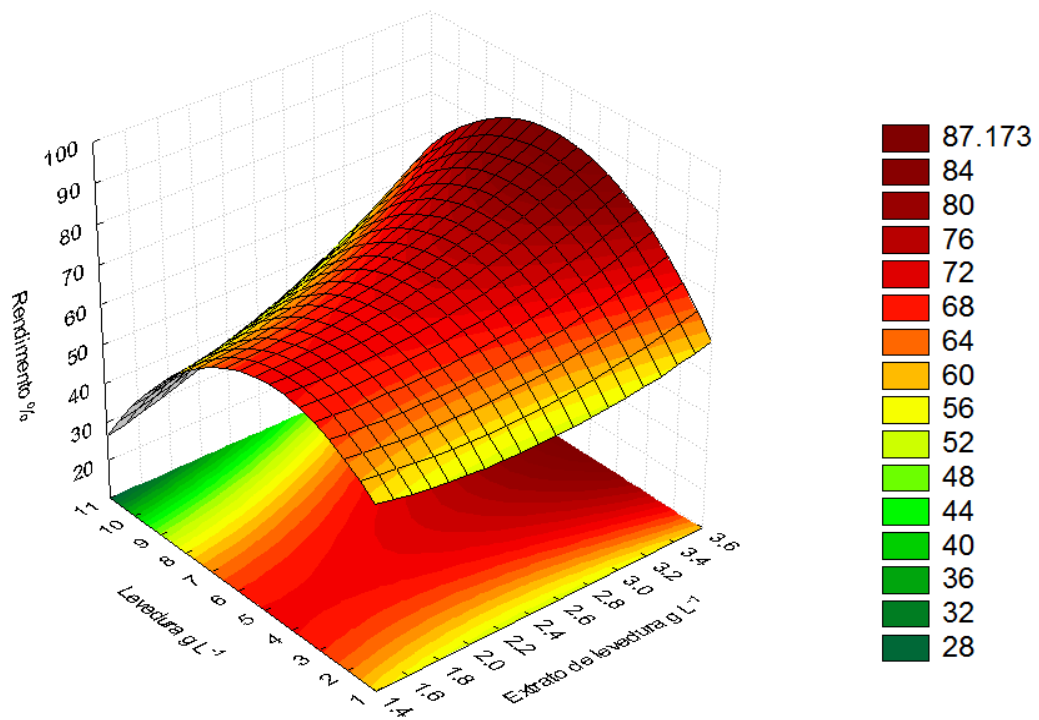
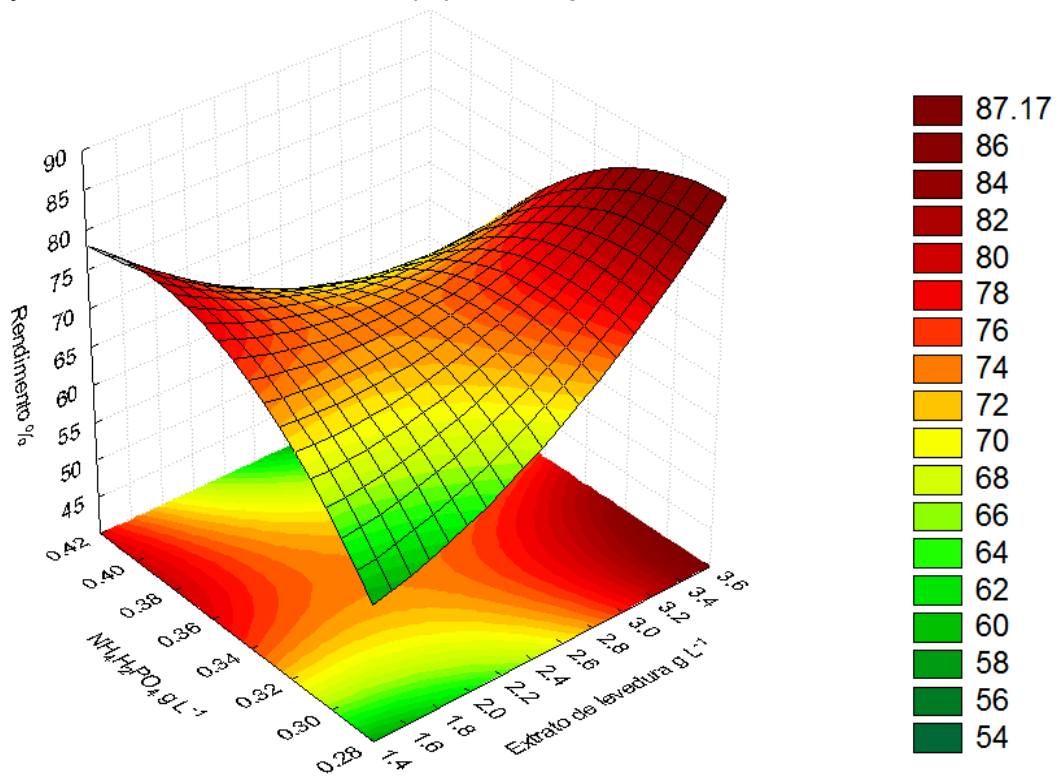
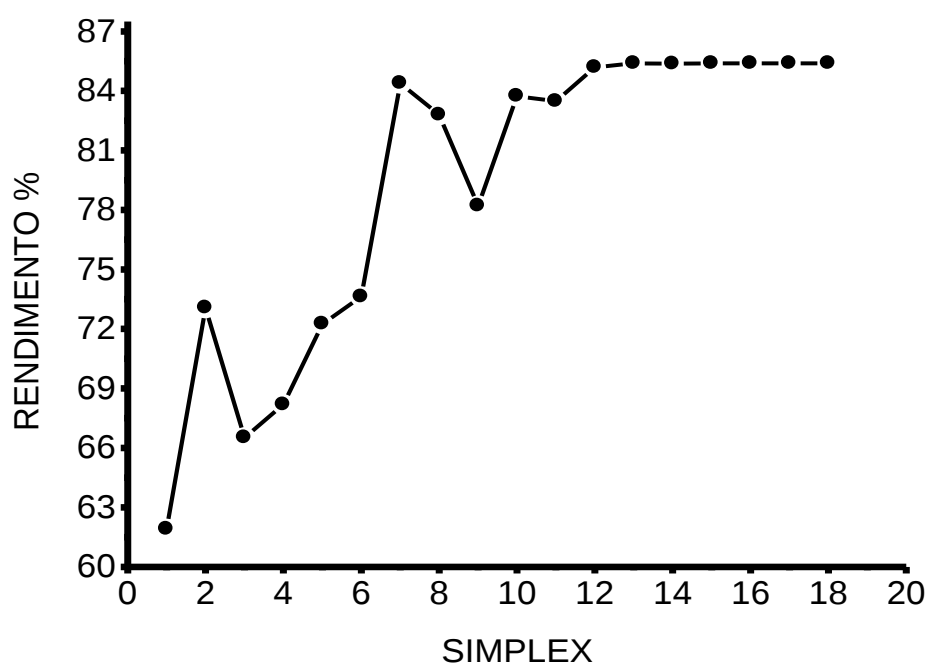


Figura 16 - Superfície de resposta de extrato de levedura e de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  para o rendimento da fermentação alcoólica fixando-se levedura ( $X_2$ ) em  $6,33 \text{ g L}^{-1}$



O aumento progressivo do rendimento da produção de álcool, em direção à resposta ótima, a convergência e a estabilização dos valores das respostas podem ser vistos na Figura 17. O máximo rendimento de 85,40% foi encontrado a partir do vértice 13. A Figura mostra que o rendimento da reação tende rapidamente ao seu valor ótimo após os seis primeiros simplex. A convergência (critério de parada) foi conseguida em razão da função-resposta rendimento da reação e das variáveis independentes deixarem de crescer a menos de  $10^{-3}$  que foi usado, pelo método simplex, como critério de convergência dos parâmetros estudados.

Figura 17 - Rendimento de etanol em função da estabilização do simplex



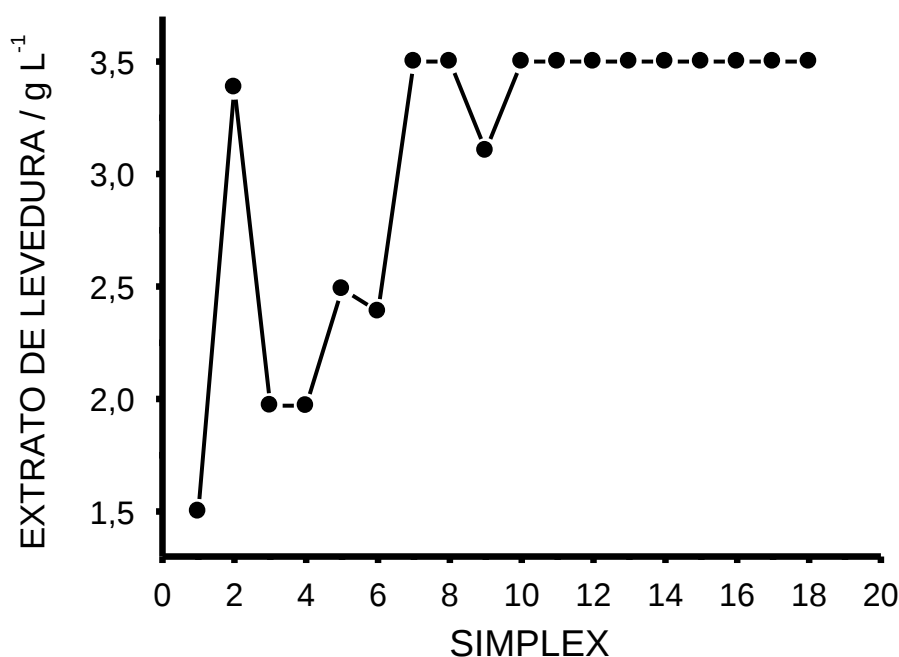
Na Figura 18, pode-se observar estabilização da variável independente extrato de levedura, a partir do simplex 11, e o maior rendimento de produção de etanol (85,40%) foi obtido com o limite superior de  $0,35 \text{ g L}^{-1}$ .

Com um valor próximo do intermediário de levedura ( $6,33 \text{ g L}^{-1}$ ), a variável independente estabilizou-se a partir do simplex 14 (Figura 19), para um ótimo rendimento de etanol. E para a variável independente  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , a otimização

simplex se mostrou estável a partir do simplex 10 (Figura 20), sendo esta exatamente em seu limite inferior igual a  $0,30 \text{ g L}^{-1}$ .

A validação da equação preditiva foi realizada através da fermentação do extrato aquoso de jerivá nas condições ótimas. O valor médio do rendimento, em triplicata, foi de 87,15%. Aplicando-se o teste t constatou-se que não houve diferença significativa, em nível de 5%, entre este valor médio e aquele obtido na otimização simplex que foi de 85,4%.

Figura 18 - Estabilização do valor da variável independente extrato de levedura, em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica



O rendimento de 87,15% é menor do que aquele tradicionalmente encontrado na fermentação alcoólica descontínua ou semi-contínua quando se usa o mosto constituído por caldo de cana ou melaço, ou ainda por mistura destes dois componentes (PRESCOTT, 1949; SILVA et al, 2006).

Silva et al. (2008) otimizaram a fermentação do mosto de cana utilizando como ferramenta estatística a metodologia de superfície de resposta e obtiveram, em fermentação descontínua, um rendimento de 88% valor muito próximo ao valor

obtido no experimento 6 (Tabela 2), que utilizou  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $6 \text{ g L}^{-1}$  de levedura e  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Entretanto, essas comparações devem ser tratadas com reservas, uma vez que os meios empregados não são os mesmos.

Figura 19 - Estabilização do valor da variável independente levedura, em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica

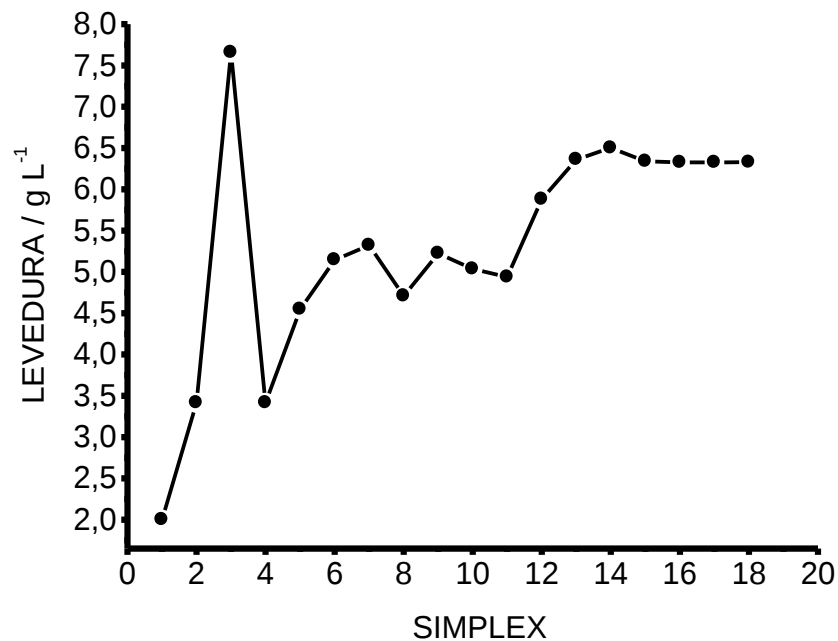
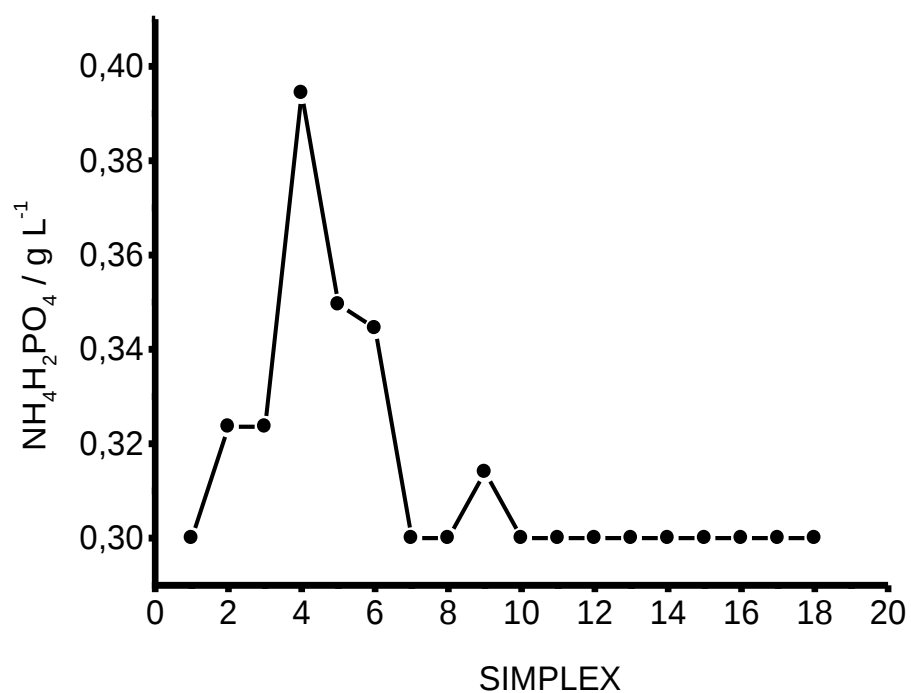
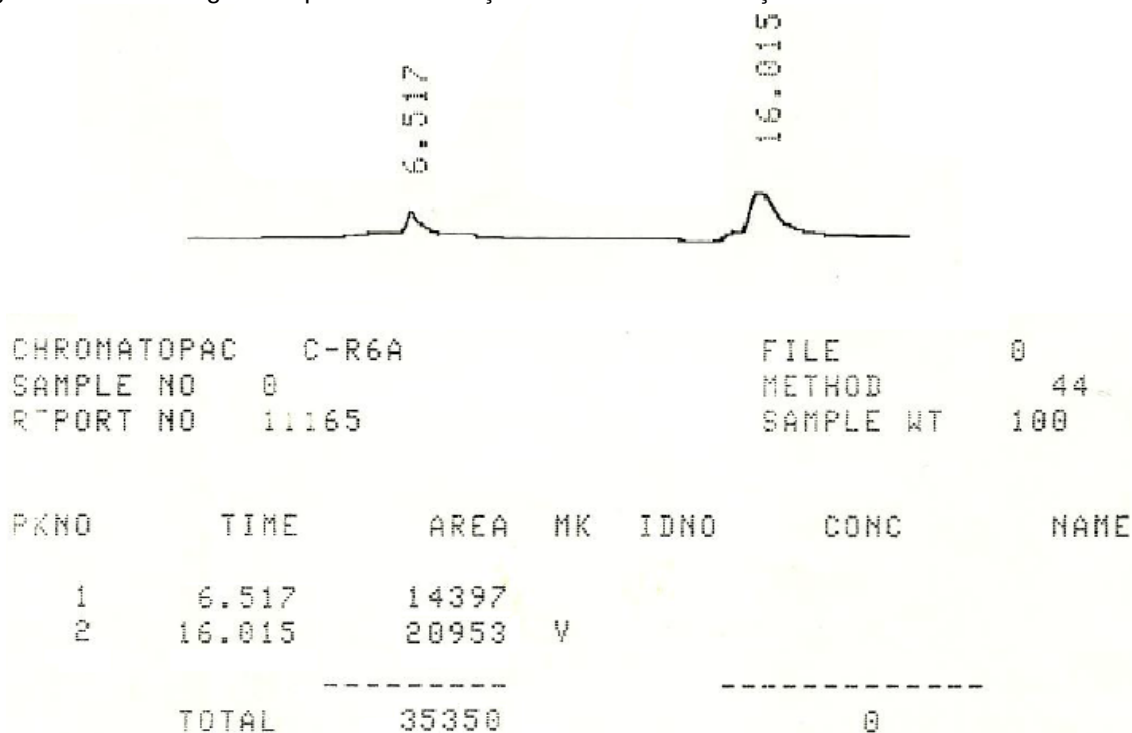


Figura 20 - Estabilização do valor da variável independente  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , em função do simplex, na otimização do rendimento do processo de fermentação alcoólica



Para verificar o rendimento encontrado no presente trabalho realizou-se uma cromatografia (Figura 21) após a fermentação do extrato aquoso da polpa de jerivá e notou-se que, a presença de  $7,3 \text{ g L}^{-1}$  de FOS, no extrato aquoso, pode ter contribuído para um menor rendimento visto que este tipo de carboidrato não é totalmente fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 21 - Cromatograma após a fermentação alcoólica nas condições ótimas estabelecidas

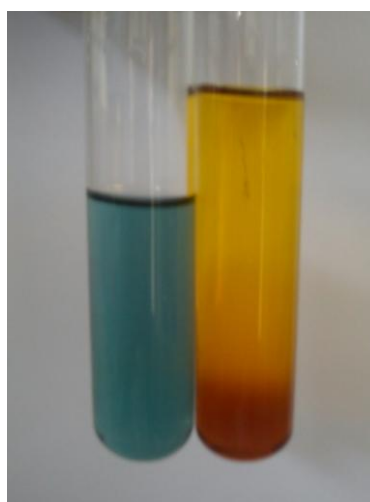


A análise cromatográfica mostrou a presença do etanol e apresentou o mesmo pico cromatográfico com uma diminuição da concentração de frutooligossacarídeos comprovando que a levedura utilizou-se do FOS como fonte de carboidrato para produção de etanol, mas não por completo após a fermentação de 8 horas, utilizando-se das concentrações das variáveis obtidas na otimização simplex. Os tempos de retenção apresentados foram de 6,517 e 16,015 minutos para o FOS e etanol respectivamente.

Realizou-se também uma fermentação alcoólica contendo apenas  $10 \text{ g L}^{-1}$  de FOS e com as concentrações das variáveis (levedura, extrato de levedura e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) determinadas pela otimização. Após 8 horas obteve-se uma produção de etanol comprovada com teste qualitativo de ácido sulfúrico/dicromato de potássio (oxidante Jones), e teste quantitativo de teor de álcool sendo que, na figura 21 o tubo com a solução alaranjada (direita) tem a presença de FOS sem a realização da fermentação alcoólica e o tubo com a solução de coloração esverdeada (esquerda), também com FOS, mostra a presença de etanol obtido na fermentação alcoólica, e com titulação de dicromato de potássio com sulfato ferroso amoniacal obteve-se uma concentração de  $4,87 \text{ g L}^{-1}$  de etanol.

Além disso, um ensaio de destilação do etanol obtido pela fermentação nas condições ótimas estabelecidas pela aplicação do método simplex, utilizando uma coluna de Vigreux, produziu uma solução aquosa contendo 56% de álcool etílico.

Figura 22 - Teste qualitativo para presença de etanol (verde) na fermentação do FOS.  
Fonte: o autor



## 7 CONCLUSÃO

O jerivá, *Syagrus romanzoffiana*, utilizado no presente trabalho, sendo, especificamente o extrato aquoso da polpa dos seus frutos, se mostrou adequado e com potencial para a obtenção de etanol devido à quantidade de carboidratos com uma concentração de  $60 \text{ g L}^{-1}$  e um ótimo rendimento na produção do álcool chegando a 87,15%. Podendo ser empregado como uma nova fonte alternativa à cana de açúcar, mas não unicamente em larga escala, mas também para uma agricultura familiar, e atender um consumo local, sendo que o jerivá pode ser encontrado em diferentes habitats e o processo de produção do etanol ser de fácil aplicação devido às simples variáveis do processo como uma temperatura de  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , extrato de levedura a  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ , levedura a  $6,33 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a  $0,30 \text{ g L}^{-1}$ .

A modelagem utilizando a superfície de resposta combinada com o método simplex supermodificado mostrou ser eficiente e relativamente simples como estratégia de otimização podendo ser considerado de grande utilidade na pesquisa e desenvolvimento de processos de fermentação alcoólica.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N. Biochemical Engineering, **Academic Press. Inc.**, 2 ed, p. 434, 1973.

ALVES-COSTA, C. P.; Efeitos da defaunação de mamíferos herbívoros na comunidade vegetal. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 107, 2004.

AMORIM, H. V., LEÃO, R. M. A experiência do pró - álcool. Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia, p. 190–191, **Fermentec**, Piracicaba, SP, 2005.

AMORIM, H.V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: **Semana de fermentação alcoólica “Jaime R. de Almeida”**, Anais. Piracicaba: ESALQ, p.144 – 148, 1985.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZANI, W. Alimentos e bebidas obtidos por fermentação. São Paulo, Edgard Blucher, **Biotecnologia**, v. 5, 1983.

ASHWATH, N. Evaluating Biodiesel Potential of Australian Native and Naturalised Plant Species. Publicação eletrônica pela Rural Industries, Research and Development Corporation. 2010. Disponível em: <<http://www.rirdc.gov.au>>. Acesso em: 27/05/2012.

BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F H ; BORSATO, D. ; BRIONES, A.; ÚBEDA, J. Extracellular  $\beta$ -glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: Optimization using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 27, p. 374-381, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Otimização Simplex, Editora Unicamp, p. 217-237, 1995.

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos aplicações na ciência e na indústria**, Ed. Bookman companhia, 4 ed., 2010.

BASTOS, V. D. ETANOL, ALCOOLQUÍMICA E BIORREFINARIAS, BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.

BERNACCI, L. C.; MARTINS, F. R. & SANTOS, F. A. M. 2006. Dinâmica populacional da palmeira nativa jerivá, *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_3/jeriva/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/jeriva/Index.htm)>. Acesso em: 20/10/2012.

BEVERIDGE, G.S.G.; SCHECHTER, R.S. Optimization theory and practice. **Tokyo: Mac Graw-Hill & Sons**, 1987.

BIODIESELBR (Org.). MATÉRIA PRIMA PARA BIODIESEL. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/oleaginosas.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 27, p. 21-38, mar. 2008.

BONA, E.; BORSATO, D.; SILVA, R.S.F.; HERRERA, R.P. Desenvolvimento de um programa computacional para a otimização de sistemas utilizando o método Simplex **Supermodificado**. **VIII Encontro Anual de Iniciação Científica**. v. 1, p. 181-182, 1999.

BONA, E.; HERRERA R.P.; BORSATO, D.; SILVA, R.S.F. Otimização de variáveis contínuas e discreta. **IX Encontro Anual de Iniciação Científica**. v. 1, p. 582-583, 2000.

BONA, E.; BORSATO, D.; SILVA, R.S.S.F.; HERRERA, R. Aplicativo para otimização empregando o método simplex sequencial. **Acta Scientiarum**, v.22, n.5, p.1201-1206, 2000.

BORSATO, D., Análise de sistemas alimentares através de delineamentos fatoriais: otimização, **Dissertação de Mestrado**, 1983.

BORZANI, W. Concentração de leveduras no fermento prensado. **Engenharia Química** 7ºed, p 5-7. 1955.

BOX, G.E.P.; BENHKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, n. 2, v. 4, p. 455-475, 1960.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. **E-papers Serviços Editoriais Ltda**, Rio de Janeiro, 2003.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. Cartas climáticas do Paraná. CD-ROM, Londrina: IAPAR, 2000.

CESAR, M. A. A.; DELGADO, A. A.; CAMARGO, A. P.; BISSOLI, B. M. A.; SILVA, F. C.; **STAB**, 5ºed, p.32, 1987.

CORDENUNSI, B.R.; SILVA, R.S.S.F.; SRIVASTAVA, K.C.; FABRE-SANCHES, S.; PERRE, M.A. Mathematical model for the alcoholic fermentation in batch culture: Comparison between complete and incomplete factorial (33) designs. **Journal of Biotechnology**, v.2, p.1-12, 1985.

CRUZ, M. R. M., e BORZANI, W. Fermentação alcoólica de melaço e de caldo de cana de açúcar por *Zymomonas*: Ensaio preliminares. **Revista Brasil Technology**, 11ºed, p 51 – 57, 1980.

DA SILVA, R. S.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, C. L. F.; PALADINO, P. V., Otimização de fermentação alcoolica em meio sintético usando o método super simplex modificado, **Arq. Biology Technology**, n. 3, p. 507-517, 1987.

DONATTI, C. I. Consequências da defaunação na dispersão de sementes e no recrutamento de plântulas da palmeira brejaúva (*Astrocaryum aculeatissimum*) na Mata Atlântica. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Piracicaba,

p. 102, 2004.

DUBOIS, N.; GILLES, K.A.; HEMILTON, J.K.; REBERS, B.A.; SMITH, F. Colorimetric method determination of sugars and substances, **Analytical Chemistry**, v. 23, p. 350- 356, 1956.

EIRAS, S.; ANDRADE J.C. O uso do simplex modificado como estratégia de otimização em química analítica. **Química Nova**, n. 19, v. 1, p. 25-29, 1996.

FERNANDES, A. C.; Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar, **STAB**, v.2, p. 237, 2003.

FLEURY, M. Efeito da fragmentação florestal na predação de sementes da palmeira jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) em florestas semidecíduas do estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 101, 2003.

GACULA JR., M.C. Design and Analysis of Sensory Optimization, **Food and Nutrition Press**, Conn. USA, 1993.

GUIX, J. C. & RUIZ, X. Plant-disperser-pest evolutionary triads: how widespread are they?. **Orsis**, 15<sup>ed</sup>: p. 121-126, 2000.

HAULY, M.C.O.; SILVA, R.S.F.; RAO, C.S. Produção de celulase: uma análise pela metodologia da superfície de resposta: Otimização de nutrientes. **Revista Brasil Technology**, v. 11, p. 1-11, 1980.

HEDLUND, P.; GUSTAVSSON, A. Design and evaluation of effective modified simplex method. **Analytical Chemistry Acta**, n. 39, v. 1, p. 257-267, 1999.

HENIKA, R.G. Simple and effective system for use with response surface methodology. **Cereal Scientific Today**, St. Pauly, v. 17, p. 309, 1972.

HEYD, E.; BARDOT, I.; BOURRIOT, P. Comparison of optimization algorithms in formulation on a sensory basis. **Food Qual. Prefer.**, n. 8, v. 1, p. 73-80, 1997.

HIMMELBLAU, D.M. Applied Nonlinear Programming. cap. 4: Unconstrained Minimization Procedures without using derivatives (search methods), McGraw-Hill, p. 148-177, 1972.

HILL, W. J. HUNTER, W. G. A review of response surface methodology: a literature survey. **Technometrics** 8<sup>ed</sup>, p. 571-590, 1966.

JOGLEKAR, A.M.; MAY, A.T. Product excellence through design of experiments, **Cereals Foods World**, v.32, n.12, p.854-868, 1987.

JORGE, N., COIMBRA, M. C. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits, **Department of Food Engineering and Technology**, São Paulo State University, São José do Rio Preto, Brazil, 2011.

JONES, R.P.; GADD, G.M. Enzyme Microb. Technol., 1990. v. 12: 1-17 apud STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*, **Food Technology. Biotechnology**. v.42 (2), 2004, p.115 –120.

JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation. **Process Biochemistry**, p. 48–60, 1984.

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

KOHLHEPP, G., Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil estudos avançados, n.24, v. 68, 2010.

KOHLHEPP, G. Conflitos de interesse na produção agrícola da América Latina. Produção de alimentos básicos versus produção de exportação e cultivo das culturas energéticas. Lançamentos da Sociedade de Geografia, em Munique, München, n.68, p.141-73, 1983.

KOLB, E. Vinos de frutas – Elaboración artesanal e industrial, Zaragoza, Espanha, Ed. Acribia, p. 232, 2002.

LORENZI, H.. Palmeiras no Brasil, nativas exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, p. 303, 1996.

LORENZI, H. Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 4ª ed., v. 1, p368, 2002.

LORENZI, H. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, p. 160, 2004.

LORENZI, H.; KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. Em “Flora Brasileira Arecaceae (Palmeiras)”- Nova Odesa, SP, **Instituto Plantarum**, p. 3472010.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program, **Energy Policy**, n.27, p.229- 245, 1999.

LACHEFSKY, K. & TEIXIERA, W, GT Energia AGRONEGÓCIO + AGROENERGIA: Impactos Cumulativos e Tendências Territoriais da Expansão das Monoculturas para a Produção de Bioenergia, 2006.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D.L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W.R.N. São Paulo: Ed. SARVIER, Tradução de: **Principles of biochemistry**, 2ªed., 1995.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L.V.; O biocombustível no Brasil, **Novos estudos**, CEBRAP v. 78, p.15-2, julho, 2007.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. São Paulo, Edgard Blucher, **Biotecnologia**, v.1, 1975.

LIMA, U.A. Aguardentes. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.) Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo, Edgard Blücher, v. 4, p. 145–182, 2001.

MAZZA G., Jerivá, Família: Arecaceae, alt Palmae – fotógrafo científico, 2012.

MORGAN, E.; BURTON, K.W.; NICKLESS, G. Optimization using the super modified simplex method. **Chemom. Intell. Laboratory System**, 8:97-107, 1990.

NAKAI, S.; KOIDE, R.; EUGESTER, K.A. A new mapping super-simplex optimization for food products and process development. **Journal Food Scientific**. n. 49, v. 4, p.1143-1148, 1984.

NELDER, J.A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. *Computer J.* v. 7, p. 308-312, 1965.

NELSON, N. J. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose, **Journal Biology Chemistry**, p. 375, 1944.

NOEL, F. L. Etanol: o desafio do combustível verde, **Problemas Brasileiros**, n. 382, jul/ago, 2007.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, A.J.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.; CESAR, M.A.A.; VALSECCHI, O. I curso de extensão em tecnologia de aguardentes (apontamentos). Piracicaba, ESALQ/USP. Deptº. de Tecnologia rural, p. 104, 1974.

OLIVÉRIO, J. L. Brazilian sugar cane sector – evolution, trends, sustainability. São Paulo, CD-ROM, 2008.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in the cachaça distillery. **Revista Microbiológica**, v.29, p. 69-79, 1998.

PAULY, N.D. ; CAVALLINI, D.C.U. ; MANZONI, M. S. J. ; MIGUEL, D. P. ; BORSATO, D. ; ROSSI, E. A. . Optimization of a synbiotic formulation of soy yoghurt containing yacon extract by response surface methodology. *International journal of probiotics & prebiotics*, v. 5, p. 211-216, 2010.

PELCZAR, M., REID, R.; CHAN, E. C. S.; Microbiologia, São Paulo, McGraw, v.1, 1980.

PIRES, M.V.P.; BORSATO, D.; SILVA, R.S.F. Desenvolvimento de aplicativo para microinformática visando a otimização de sistemas alimentares. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro. Anais SBCTA, v.3, p.1565-1568, 1998.

PIRES, A S. Perda de diversidade de palmeiras em fragmentos de Mata Atlântica:

padrões e processos. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.108, 2006.

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. Industrial Microbiology, 2ª ed., Mac Graw-Hill; Nova Iorque, EUA, p. 113, 1949.

RICHARD, C. BRAZIL: A WORLD LEADER, Brazil: a world leader, **Sugar Journal**, n. 69, p. 11–15, 2006.

RODRIGUES, D. ORTIZ, L. Em direção a sustentabilidade da produção de etanol de cana de açúcar no Brasil, p. 1-37, 2006.

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P.; Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.695-698, 2006.

SILVA, J.A.; DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, F.L.H.; MADRUGA, M.S.; SANTANA, D.P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1073-1077, 2008.

SPENDLEY, W.; HIMSWORTH, F.R.; HEXT, G.R. Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary operation. **Technometrics**, v. 4, p. 441-461, 1962.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*, **Food Technology. Biotechnology**. v.42, n. 2, p.115 – 120, 2004.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da Fermentação alcoólica, *Saccharum*, **STAB**, vol. 4, p 43, 1985.

UNICA. Produção e uso do etanol combustível no Brasil. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>.

XAVIER, M. The Brazilian sugarcane ethanol experience. **Issue analysis** 3, Washington, DC, 2007. Disponível em: <<http://www.cei.org/pdf/5774.pdf>>.

WARD, O. P. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza – Espanha, Ed. ACRIBIA, S.A., p. 155, 1991.

WHITE, J., Yeast technology, London, Chapman and Hall, p.432, 1954.

ZIMMERMAN, H. W. Studies on the dichromate method of alcohol determination. In: Methods in Food Analysis, 2ª ed, p 457-458. **Academic Press**, New York. 1970.