



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE DE SOUZA CARDOSO

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DO EXTRATO AQUOSO DA
POLPA DO BUTIÁ:**

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO UTILIZANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

CAROLINE DE SOUZA CARDOSO

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DO EXTRATO AQUOSO DA
POLPA DO BUTIÁ:
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO UTILIZANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Dissertação apresentada para a obtenção ao título de mestre na Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, com Área de Concentração em Biocombustíveis.

Orientador(a): Prof. Dr. Dionisio Borsato

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C268p Cardoso, Caroline de Souza.
Produção de álcool do extrato aquoso da polpa do butiá : otimização do processo
utilizando a metodologia de superfície de resposta / Caroline de Souza Cardoso. –
Londrina, 2014.
65 f. : il.

Orientador: Dionísio Borsato.
Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis – Teses. 2. Butia eriospatha – Teses. 3. Álcool como combustível
– Teses. 4. Polpa de frutas – Fermentação – Teses. I. Borsato, Dionísio. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em
Bioenergia. III. Universidade Estadual de Maringá. IV. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. V. Universidade Estadual do Centro-Oeste. VI. Universidade Estadual
do Oeste do Paraná. VII. Título.

CDU 661.72

CAROLINE DE SOUZA CARDOSO

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO
BUTIÁ:
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, da Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, com Área de Concentração em Biocombustíveis.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dionísio Borsato
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Olívio Fernandes Galão
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Paulo Henrique Caramori
IAPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Ricardo Celeste
UNICENTRO – Cascavel – PR

Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete
UEL – Londrina – PR

Londrina, 15 de janeiro de 2014.

A Deus, minha família, meu noivo, meu orientador, pelo incentivo, apoio, críticas e todo carinho nos momentos em que mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao Prof. Dionisio Borsato, meu orientador e o grande idealizador desse projeto. Sem dúvida nenhuma, todo seu sucesso se deve à sua garra e incansáveis horas de trabalho no laboratório, que me inspiraram e ainda me inspiram a dar o meu melhor em tudo que faço. Muito obrigada pelos ensinamentos, e sobretudo pela sua amizade.

A todos aqueles que, desde que cheguei em Londrina, vêm me apoiando e ajudando nas minhas principais dificuldades, que estavam presentes no Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis ao meu lado como o Diego Galvan, Kelly Spacino, Elisângela Tavares, Guilherme Arielo, Cezar Furtoso, o meu muito obrigada.

A um grande amigo e anjo da guarda Lucas Emmanuel Semeão, que mesmo estando ocupado com seu mestrado soube me dar atenção e muita energia positiva quando estava precisando.

Quero agradecer àquelas pessoas que mesmo não estando próximas nos momentos mais difíceis, estavam nos bastidores torcendo, apoiando e orando por mim. Minha mãe Maria Aparecida de Souza e ao meu pai João de Souza Cardoso agradeço pela vida, pela educação, pela minha formação pessoal e pelo amor que de maneira única expressaram por mim. Ao meu irmão Maycon que igualmente contribuiu durante o meu crescimento como pessoa. E a todos os demais familiares que igualmente amo.

Estas últimas linhas foram guardadas para duas pessoas essenciais e super importantes na minha vida. Meu amigo, companheiro, conselheiro, ajudante, meu grande amor e meu noivo João Antonio Moreira, sem o qual meu mundo seria vazio e sem nenhuma graça, ele é a força que me move a alcançar meus sonhos. Sem seu apoio, paciência e companheirismo eu não teria chegado até aqui. E a Jesus Cristo, autor e consumador da vida, que em sua onipresença sempre esteve ao meu lado, guiou os meus passos e colocou todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

"Não há maior demonstração de insanidade do que fazer a mesma coisa, da mesma forma, dia após dia, e esperar resultados diferentes".

Albert Einstein.

CARDOSO, Caroline. **Produção de álcool do extrato aquoso da polpa do Butiá: otimização do processo utilizando a metodologia de superfície de resposta.** 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O gênero *Butiá* é amplamente distribuído na Região Sul do Brasil e constitui parte importante da biodiversidade presente no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Por apresentar açúcares redutores seu extrato aquoso foi submetido ao processo de fermentação alcoólica. As condições de fermentação foram estabelecidas e um delineamento fatorial incompleto de Box-Behnken foi aplicado. Como variáveis independentes foram utilizadas o extrato de levedura, levedura e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e o rendimento de álcool obtido foi otimizado. A validade do modelo para fins preditivos foi confirmada pela análise de variância, verificando efeito significativo em nível de 5 % com coeficiente de determinação (R^2) experimental de 82,03 % e desvio da regressão ($p= 0,0715$) não significativo. A otimização indicou uma formulação contendo $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $6,0 \text{ g L}^{-1}$ 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 77,95 %. Para a validação da equação preditiva o experimento foi repetido em triplicata, nas condições ótimas estabelecidas, obtendo-se um valor médio de 78,00 % 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.

Palavras-chave: Delineamento Box-Behnken. Delineamento experimental. Fermentação alcoólica. Rendimento.

Cardoso, Caroline. **Alcohol production from the pulp of the *Butia* aqueous extract**: process optimization using response surface methodology. 2014. 65p. Dissertation (Master's degree in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 204.

ABSTRACT

The genus *Butia* is widely distributed in southern Brazil and is an important part of local biodiversity. An aqueous extract was subjected to an alcoholic fermentation process using the reducing sugars present. The fermentation conditions were established and an incomplete Box-Behnken factorial design was applied. The independent variables used were yeast extract, yeast and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, and the alcohol yield obtained was optimized. The validity of the model for predictive purposes was confirmed by analysis of variance, verifying significant effect at 5 % with a coefficient of determination (R^2) of 82.03 % and experimental deviation from regression ($p = 0.0715$) is not significant. The optimization indicated a formulation containing 3.0 g L^{-1} yeast extract, 6.0 g L^{-1} yeast and 0.30 g L^{-1} $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ for an optimum ethanol yield of 77.95 %. To validate the predictive equation the experiment was repeated in triplicate under optimum conditions, resulting in an average yield of 78.00 %. Applying the t test, it was determined that there was no significant difference at the 5 % level between the average value and the one predicted in the optimization.

Keywords: Alcoholic fermentation. Box-Behnken design. Experimental design. Yield.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Venda de carros a álcool e flex fuel no Brasil, 1979-2008. Fonte: ANFAVEA, 2009.	24
Figura 2 - Os Tipos de Álcool Etílico. Fonte: ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009.....	25
Figura 3 - <i>Butia eriospatha</i> (Martius) Beccari. Fonte: o autor.....	32
Figura 4 - Caracterização de diferentes partes e formatos de frutos de <i>Butia capitata</i> (Mart.) Beccari: a) frutos com diferentes formatos; b) um fruto; c) pirênio e corte transversal com uma e duas sementes; d) corte transversal do fruto (1- exocarpo; 2- mesocarpo; 3- endocarpo; 4- semente). Fonte: MOURA, 2010	33
Figura 5 - Maturação do fruto <i>Butia eriospatha</i> (Martius) Beccari. Fonte: o autor.....	34
Figura 6 - Frutos de <i>Butia eriospatha</i> (Martius) Beccari. Fonte: o autor	35
Figura 7 - Cromatografia Líquida de alta eficiência – Marca Shimatzu. Fonte: o autor.....	41
Figura 8 – Bomba LC-10AD, forno CTO-10A, detector de índice de refração RID-10A e integrador C-R6A. Fonte: o autor	42
Figura 9 - Erlenmeyers incubados na estufa a 30 °C. Fonte: o autor.....	43
Figura 10 - Microdestilador TE-012 Tecnal. Fonte: o autor	44
Figura 11 – Cromatograma do Padrão de FOS comercial. Fonte: o autor	47
Figura 12 - Cromatograma do Padrão de FOS P.A. Fonte: o autor.....	48
Figura 13 - Cromatograma do Padrão de Sacarose. Fonte: o autor.....	48
Figura 14 - Cromatograma do Padrão de Glicose. Fonte: o autor.....	49
Figura 15 - Cromatograma do Padrão de Frutose. Fonte: o autor	49
Figura 16 - Cromatograma do extrato aquoso do Butiá inicial. Fonte: o autor.....	50
Figura 17 - Rendimento da produção de etanol, em %, em função do tempo de fermentação. Os pontos representam os dados experimentais e a curva os dados ajustados. Fonte: o autor	51
Figura 18 - Gráfico de Pareto mostrando as variáveis mais significativas. Fonte: o autor.....	53

Figura 19 - Valores experimentais observados vs. valores estimados. Fonte: o autor.....	54
Figura 20 - Otimização das variáveis dependentes e independentes utilizando o aplicativo Statistica 9.0. Fonte: o autor.....	55
Figura 21 - Superfície de resposta para o rendimento da fermentação alcoólica, em %, fixando-se a concentração do extrato de levedura em 3,0 g L ⁻¹ . Fonte: o autor	56
Figura 22 - Cromatograma do extrato aquoso após a fermentação nas condições ótimas estabelecidas. Fonte: o autor	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de açúcar, 1840 – 1940. Em mil toneladas métricas. Fonte: MOURA FILHO, 2003.....	18
Tabela 2 – Preço do petróleo importado pelo Brasil, 1973 – 1984 <i>US\$/barril</i> . Fonte: GUSMÃO, 1985	19
Tabela 3 – Evolução da venda de carros <i>flex fuel</i> no Brasil, 2003 – 2008. Fonte: ANFAVEA, 2009	20
Tabela 4 – Contribuições para o aquecimento global. Fonte: LOVELOCK, 2007	21
Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis de variação. Fonte: o autor	45
Tabela 6 – Nível de variação, variáveis independentes codificadas e produção de álcool, em g L ⁻¹ e rendimento do processo de fermentação em %. Fonte: o autor	52
Tabela 7 – Análise de variância do rendimento da reação de fermentação alcoólica da polpa de butiá usando o delineamento fatorial incompleto 3 ³ . Fonte: o autor	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Determinação do teor de álcool	45
Equação 2 - Determinação do rendimento em porcentagem de etanol obtido.....	45
Equação 3 - Modelo matemático.....	46
Equação 4 - Equação da regressão do delineamento experimental em função do rendimento(Y).....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANFAVEA	Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
B5	5 % biodiesel e 95 % mistura de diesel
FFV	Flex Fuel Vehicle
FOS	Frutooligossacarídeos
G.L.	Graus de liberdade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MSR	Metodologia da Superfície de Resposta
PPGBI	Programa de Pós Graduação em Bioenergia
PPM	Partes por milhão
PRÓALCOOL	Programa Nacional do Alcool
PROBIODIESEL	Programa Brasileiro de Biodiesel
PRO-ÓLEO	Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Carburantes
SCP	Single Cell Protein
UNICA	União da Agroindústria Canavieira de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	HISTÓRIA DOS BIOCOMBUSTÍVEIS	18
2.2	ETANOL.....	22
2.3	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
2.4	LEVEDURA	29
2.5	BUTIA ERIOSPATHA (MARTIUS) BECCARI	31
2.6	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	36
3	JUSTIFICATIVA	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	COLETA DOS FRUTOS	40
5.2	PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DO BUTIÁ	40
5.3	SUBSTRATO.....	40
5.4	ANÁLISES	40
5.4.1	Cromatografia	40
5.4.2	Determinação de açúcar total	42
5.5	LEVEDURA.....	42
5.6	SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES.....	43
5.7	FERMENTAÇÃO	43
5.8	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁLCOOL.....	44
5.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
5.9.1	Modelo Matemático	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

7	CONCLUSÕES GERAIS.....	58
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A Humanidade evolui a partir do uso de fontes de energia que consegue usar, cabe então esperar que ela mesma, devido ao declínio dos recursos energéticos e da perda da biodiversidade, dos problemas de poluição e da crise social, consiga mudar o rumo e se adaptar a um novo leque de fontes alternativas de energia, no qual caberá à biomassa um papel fundamental (CORTEZ, 2008).

Através da biomassa é possível obter vários tipos de combustíveis, em estados sólidos, líquidos e gasosos, de caráter renovável, entre os quais se encontra o álcool etílico, que é um dos mais nobres por não ser tóxico, ter transporte fácil e pode substituir em parte o consumo de gasolina. A opção pelos biocombustíveis se torna atrativa por existir diferentes rotas tecnológicas (JUNIOR, 2010).

Dessa forma não é recente o interesse de pesquisadores, empresas e governos em torno dos biocombustíveis, com o intuito de diminuir a dependência externa de petróleo, minimizar os efeitos das emissões veiculares na poluição e controlar a quantidade de lançamento de gases de efeito estufa na atmosfera (LEITE, LEAL, 2007). Assim, o foco dos países passou a se concentrar na produção de produtos agrícolas voltados à produção de energia, em especial países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil com o etanol que produz níveis de 50 bilhões de litros por ano (SOUZA, 2010).

Desde 1975, quando foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), cuja principal ambição seria substituir os veículos movidos a gasolina por outros movidos a álcool, que o lema “o álcool é nosso” se transformou em um sonho estratégico nacional (TÁVORA, 2011).

Hoje o Brasil está entre os maiores produtores de etanol do mundo, atrás somente dos Estados Unidos e juntos detêm 72 % de toda a produção mundial de etanol, produzido a partir da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente (UNICA, 2009). A cana é um produto completo porque produz açúcar, álcool e bagaço, cuja combustão pode produzir energia elétrica. Contudo, possui diversas desvantagens, como o fato de não resolver o problema da dependência do petróleo, devido à inflexibilidade no refino do mesmo (MEDINA, 1996).

A possibilidade de encontrar matérias primas alternativas que tenham rendimento e viabilidade semelhantes à da cana de açúcar, não só para a produção em larga escala, mas também para uma agricultura familiar, assim como atender o

consumo local, viabiliza os estudos na área. Entre estas alternativas encontram-se em larga existência natural as palmeiras que possuem em seus frutos carboidratos, importantes para a produção de etanol, pois possibilitam a fermentação alcoólica. No Brasil, estão distribuídas em torno de 119 espécies de 39 gêneros diferentes (DONATTI, 2004).

Dentre as espécies, se encontra o *Butia eriospatha* (Martius) Beccari que pertence à família Arecaceae (Palmae), nativa da América do Sul (HENDERSON et al., 1995), popularmente conhecida por butiá ou butiá-da-serra (REITZ, 1974). A planta produz frutos globosos, suculentos, adocicados, de 1,7 a 1,9 cm de diâmetro em média, cujo epicarpo contém carboidratos e torna-se amarelado na maturidade (HENDERSON et al., 1995).

Esses açúcares encontrados no extrato aquoso da polpa do butiá, na presença de microrganismos chamados de leveduras sofrem uma transformação química chamada fermentação alcoólica, em que os principais açúcares existentes no extrato da polpa como sacarose, frutose e glicose se transformam em etanol, considerando que aconteça em condições favoráveis como uma temperatura e um pH ideal. Atualmente o microrganismo agente da fermentação mais utilizado é um fungo leveduriforme denominado *Saccharomyces cerevisiae* (STUPIELLO, 1985).

Existem alguns interferentes no processo de produção, como a presença de suplementação de nutrientes como nitrogênio, fósforo e magnésio, a quantidade de levedura adicionada e as condições de trabalho que podem afetar o rendimento da fermentação alcoólica (CESAR et al., 1987).

Para encontrar valores ótimos destas variáveis na produção do etanol a partir do extrato aquoso da polpa do butiá, Borsato et al. (2010) demonstraram que a análise de sistemas podem ser feitas, teoricamente, pela formulação de modelos matemáticos, com base nos fundamentos físico-químicos e biológicos dos fenômenos que ocorrem empiricamente, pela observação das respostas a vários estímulos externos, ou seja, a partir da metodologia de superfície de resposta (BARBOSA et al., 2010). Possibilitando assim, uma minimização de custos e melhoria na qualidade dos processos (HILL e HUNTER, 1966).

O objetivo geral do trabalho foi realizar a otimização do rendimento na produção de etanol obtido do extrato aquoso da polpa de butiá, utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. Enquanto os objetivos específicos se abrangem em explorar o potencial dessa metodologia para a aplicação no processo

de fermentação alcoólica, através de uma análise crítica buscando determinar seus usos mais apropriados e aplicar métodos de otimização sem restrição, que utilizam derivadas, aplicados a modelos matemáticos empíricos gerados pela MSR. Assim como estudar a influência das variáveis extrato de levedura, levedura e suplementação de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ na otimização da produção de etanol, em fermentação alcoólica descontínua do extrato aquoso da polpa do butiá, utilizando o delineamento fatorial 3^3 incompleto de Box-Behnken.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DOS BIOCOMBUSTÍVEIS

A introdução da cana-de-açúcar no Brasil Colônia resultou em um dos negócios mais bem sucedidos da história brasileira, com produtos advindos do setor sucroalcooleiro que deu início em 1525. Houve uma consolidação como grande produto de exportação, sem concorrente à altura até surgir o açúcar produzido a partir da beterraba que, através de desenvolvimentos tecnológicos, obteve melhoramentos elevando a qualidade e se tornando semelhante ao açúcar da cana. Com isso na Europa foi exigido o consumo do açúcar de beterraba localmente (Tabela 1), fazendo com que houvesse uma crise internacional e a necessidade de novas aplicações para a cana-de-açúcar como a produção de um combustível (TÁVORA, 2011; MORAES, 2007).

Tabela 1 – Produção mundial de açúcar, 1840 – 1940. Em mil toneladas métricas.

Ano	Açúcar de cana-de-açúcar	%	Açúcar de Beterraba	%	Total
1840	773	94%	48	6%	821
1850	1.046	87%	159	13%	1.205
1860	1.364	79%	352	21%	1.716
1870	1.662	64%	939	36%	2.601
1880	1.881	50%	1.857	50%	3.738
1890	2.600	41%	3.680	59%	6.280
1900	5.285	47%	6.006	53%	11.291
1910	8.198	49%	8.668	51%	16.866
1920	12.023	71%	4.906	29%	16.929
1930	16.023	57%	11.911	43%	27.934
1940	18.245	61%	11.684	39%	29.929

Fonte: MOURA FILHO, 2003.

No século XIX, Rudolph Diesel, inventor do motor à combustão interna utilizou em seus ensaios petróleo cru e óleo de amendoim. Devido ao baixo custo e alta disponibilidade do petróleo nessa época, este passou a ser o combustível mais usado nestes motores (SUAREZ et al., 2007).

O Governo criou então o Programa Pró-Álcool iniciado em 1975, com a finalidade de garantir o suprimento de energia bem como apoiar a indústria açucareira. Com a queda do preço do açúcar surgiram mais destilarias para a transformação do excesso da produção de cana-de-açúcar em etanol anidro, usado

como aditivo na gasolina, sem que houvesse modificações nos motores dos automóveis (KOHLHEPP, 2010).

Além disso, esse programa tinha a motivação em reduzir a dependência do país em relação ao petróleo importado, que após uma trajetória de aumento linear, o valor médio do barril passou a custar de US\$ 12,27 em 1975 para US\$ 30,72 em 1980 (Tabela 2). Assim o Brasil dominou a tecnologia da produção de álcool, além do desenvolvimento dos carros a álcool e mais recentemente do carro bicom bustível (MORAES, 2007).

Tabela 2 – Preço do petróleo importado pelo Brasil, 1973 – 1984 US\$/barril.

Ano	Preços
1973	3,88
1974	12,55
1975	12,27
1976	12,97
1977	13,51
1978	13,65
1979	18,36
1980	30,72
1981	36,59
1982	35,25
1983	31,93
1984	30,50

Fonte: GUSMÃO, 1985.

Com a segunda crise do petróleo em 1979, foi expandido o Programa Pró-Álcool e com ele a produção de motores de veículos adaptados ao uso de etanol. Assim, em 1984, a gasolina vinha sendo substituída pelo álcool em sua grande maioria, cerca de 94,4 % do carros novos eram comercializados com incentivos e créditos baratos e movidos a etanol (KOHLHEPP, 2010). Após os dois choques de petróleo surgiram programas de desenvolvimento de energias renováveis, de economia de energia, de uso da energia nuclear, do gás natural e do carvão mineral (LEITE; LEAL, 2007).

Como consequência, carros a álcool hidratado (álcool como combustível) começaram a ser utilizados em grande escala em todo o país e ainda passou a ser mandatória a adição de 15 % de álcool anidro à gasolina (TÁVORA, 2011).

Foi criado também o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Carburantes (PRO-ÓLEO), elaborado pela Comissão Nacional de Energia, em 1980 com o intuito de introduzir uma mistura de 30 % de óleo vegetal ou derivado no

óleo diesel e a substituição integral em longo prazo. Entretanto o PROÓLEO foi abandonado 6 anos depois devido à queda do preço do petróleo, mas no final do século XX, o Governo Federal volta a discutir o uso de biodiesel, e em 2002, a etanolise de óleos vegetais devido à grande produção dessas matérias-primas no Brasil, foi considerada como a rota principal para um programa de substituição do diesel de petróleo (PROBIODIESEL), com proposta de substituir até 2005 todo o diesel consumido no Brasil por B5 (5 % biodiesel e 95 % mistura de diesel) e, em quinze anos, por B20 (SUAREZ et al., 2007).

O modelo *flex-fuel* desenvolvido por empresas alemãs foi apresentado no ano de 2002 e produzido em série no Brasil a partir de março de 2003 (Tabela 3). Dentre suas características está a de ser movido tanto a gasolina, quanto a etanol ou com uma mistura dos dois (KOHLHEPP, 2010).

Tabela 3 – Evolução da venda de carros *flex fuel* no Brasil, 2003 – 2008.

Ano	Vendas de carros <i>flex fuel</i>	Vendas totais	Participação
2003	48.178	1.237.021	3,9%
2004	328.379	1.457.274	22,5%
2005	812.104	1.541.494	52,7%
2006	1.430.334	1.748.758	81,8%
2007	1.995.090	2.240.857	89,0%
2008	2.329.247	2.546.352	91,5%

Fonte: ANFAVEA, 2009

Assim, não é recente o interesse em biocombustíveis entre os países, com a finalidade de diminuir a dependência externa de petróleo, minimizar os efeitos das emissões veiculares na poluição e controlar a quantidade de lançamento de gases de efeito estufa na atmosfera (LEITE; LEAL, 2007).

Desde a Revolução industrial o planeta vem sendo modificado pela industrialização e sofrendo com as transformações ambientais. A contaminação das águas e do solo, o desmatamento, o efeito estufa e a destruição da camada de ozônio são problemas que prejudicam todo o mundo (FIRMINO; FONSECA; 2001).

O aquecimento global já vem mostrando evidências de que a temperatura da Terra estava subindo desordenadamente desde a década de 1980, tendo como causa principal a queima de combustíveis e os níveis de dióxido de carbono na atmosfera, considerado o principal gás de efeito estufa, cuja concentração havia subido de 280 PPM (partes por milhão), índice que prevalecia

antes da Revolução Industrial, para 368 PPM em 2007, como apresenta a Tabela 4 (LEITE; LEAL, 2007).

Tabela 4 - Contribuições para o aquecimento global.

Gás	Concentrações pré-industriais (ppm)	Concentrações no ano de 2007 (ppm)	Contribuição para o aquecimento global (%)	Efetividade do aquecimento	Fontes humanas
CO ₂	280	368	49	1	Combustão de combustíveis fósseis; desmatamento; mudança do uso de terra; queima de biomassa.
CH ₄	0,7	1,7	18	25	Agricultura de terra úmida; fermentação entérica no gado e nos cupins; vazamento de instalações para exploração de gás e petróleo; queima de biomassa.
CFC	-	0,0004	14	10.000	Refrigeração; condicionamento do ar; espumas de plástico, como solvente e esterilizante.
N ₂ O	0,28	0,31	6	150	Fertilizante à base de nitrogênio; queima de combustíveis fósseis; queima de biomassa.

Fonte: LOVELOCK, 2007

Para mobilizar a população na defesa do meio ambiente foram criadas medidas de investimento e gastos, dentre eles a utilização dos biocombustíveis, que são derivados de fonte renovável de energia para conter o efeito estufa.

A legislação brasileira define o Biocombustível como derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil. O combustível renovável pode ser derivado de álcool (etanol) ou de óleos vegetais (biodiesel) (FIRMINO; FONSECA; 2001).

Atualmente, o Brasil é internacionalmente reconhecido pelo pioneirismo em desenvolver a produção e uso em larga escala de um combustível

renovável, produzido a partir da cana-de-açúcar, com alta eficiência energética e com os menores custos de produção do mundo (MORAES, 2007).

Recentemente a Petrobrás anunciou descobertas de enormes reservas de petróleo e gás em camadas profundas na região de *off-shore (pré-sal)* entre o litoral do Espírito Santo e de São Paulo. Entretanto, a busca mundial de energias alternativas, ou seja, de biocombustíveis, vem crescendo em razão do preço do petróleo (KOHLHEPP, 2010).

Hoje, os biocombustíveis em uso comercial no mundo são o etanol e o biodiesel, nos níveis de 50 bilhões de litros e 5 bilhões de litros por ano, respectivamente (LEITE; LEAL, 2007).

2.2 ETANOL

No Brasil, desde os anos 1970, a produção do etanol representa uma alternativa ecológica geradora de emprego e renda. Os primeiros passos do país rumo à produção de etanol foram dados pós-crise do petróleo com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975, e um novo boom de crescimento da produção de etanol ocorreu a partir do início dos anos 2000 com a introdução dos veículos biocombustíveis no mercado brasileiro (COSTA, 2010).

Para lançar o Proálcool o governo teve duas razões básicas: atenuar os efeitos do primeiro choque do petróleo, pela substituição parcial da gasolina, pois o país importava na época mais de 80 % do petróleo que consumia; e proporcionar aos produtores alternativas ao açúcar, que então atravessava um período de forte queda nos preços.

Em 1979, quando a produção de etanol alcançou 3,4 milhões de m³ (aumento de mais de 500 % desde 1975), foi implantada a segunda fase do Proálcool, no contexto do segundo choque do petróleo. A meta fundamental dessa fase do programa era a fabricação de automóveis integralmente movidos a álcool, tendo como resultado a triplicação da produção de etanol entre 1979 e 1985, chegando a ser responsável nessa época por 80 % da produção mundial de etanol, quando a quase totalidade dos veículos leves fabricados no Brasil era a álcool (BNDES, 2008).

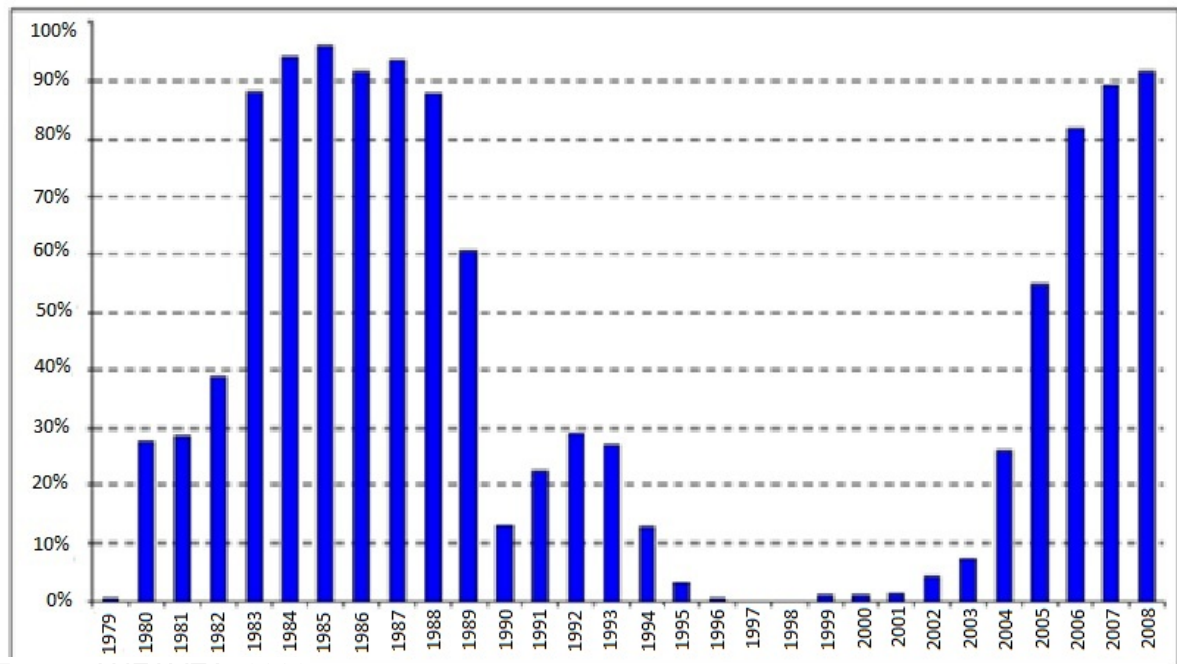
Porém o governo perdeu o interesse pelo programa em meados de 1980, passando a diminuir sua produção e competitividade perante a gasolina,

devido à queda acentuada dos preços internacionais do petróleo, que reduziu consideravelmente a atratividade de um programa apoiado, em grande medida, em incentivos governamentais. Um motivo secundário foi à elevação dos preços do açúcar, que passou a absorver parte expressiva da produção de cana. A situação da oferta interna se deteriorou a ponto de, em determinado momento, ter sido necessária a importação de etanol.

Com a obrigatoriedade do uso do anidro na mistura com a gasolina e a antiga frota de carros a álcool mantiveram o programa, sendo que o etanol estava disponível em mais de 90 % dos 30 mil postos de combustível instalados no país, apesar da falta de apoio do governo (LEITE; LEAL, 2007; BNDES, 2008).

Depois de um período de incertezas e dificuldades, ao longo da década de 1990, o interesse pelo álcool combustível no Brasil parece ter se fortalecido em virtude das novas perspectivas de mercado. Percebendo isso, em 2003 as montadoras de veículos passaram a trabalhar no desenvolvimento do motor flexível ao combustível (FFV — Flex Fuel Vehicle), que poderia operar com gasolina, etanol ou qualquer mistura desses dois combustíveis. O uso de gasolina ou etanol nesses veículos depende do preço relativo entre eles, considerando que a equivalência em quilometragem é de 0,7 litros de gasolina por litro de etanol (LEME, 2004; LEITE; LEAL, 2007).

Desse modo, a extinção dos subsídios à produção do etanol, no início da década de 1990, não significou a completa eliminação da intervenção estatal, uma vez que o governo continuou a encorajar a indústria, manteve a obrigatoriedade da adição do álcool à gasolina (ampliada de 20 % para 25 % em 1993) e estimulou o fornecimento de veículos flex fuel (Figura 1), hoje, com mais de 80 % dos carros novos. Há atualmente cerca de 3 milhões de veículos movidos a álcool hidratado e o álcool anidro é misturado à gasolina em toda a frota brasileira, de 20 milhões de veículos em virtude das vantagens econômicas que isso poderia propiciar em cenários de alta nos preços do petróleo e por causa da elevada tributação que sofrem os combustíveis fósseis em alguns países (LEME, 2004) (BNDES, 2007).

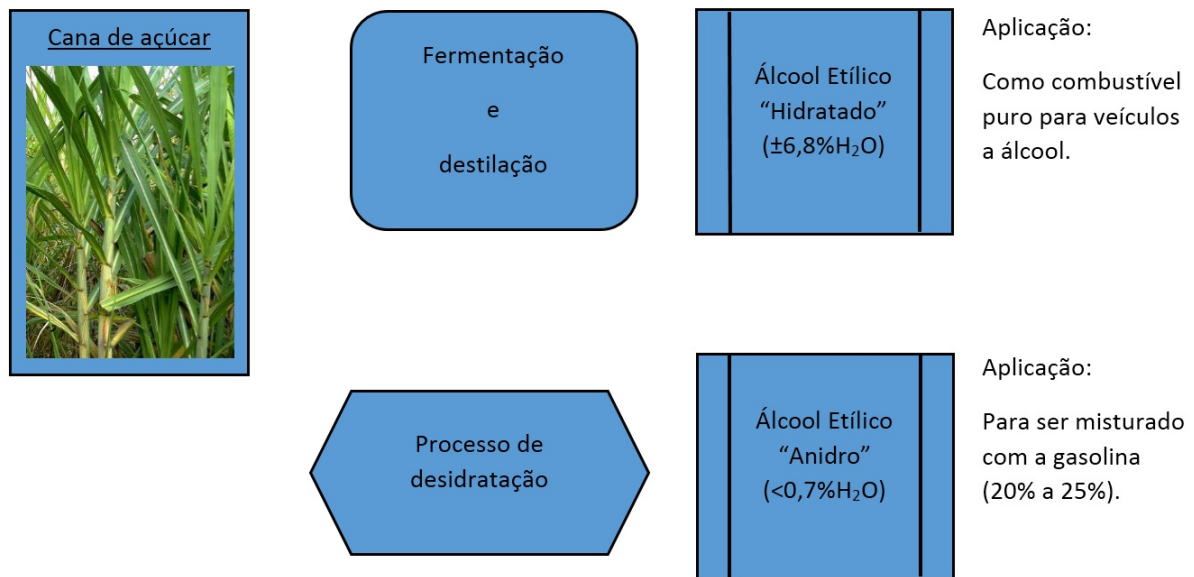
Figura 1 - Venda de carros a álcool e flex fuel no Brasil, 1979-2008.

Fonte: ANFAVEA, 2009

O etanol é hoje o principal biocombustível utilizado no mundo, embora o biodiesel, que até recentemente era produzido quase exclusivamente pela União Européia, em especial Alemanha, venha ganhando espaço em outras regiões. No total, os biocombustíveis respondem hoje por apenas 2 % da energia utilizada [International Energy Agency (2005)], mas seu uso está cada vez mais difundido e a aposta mundial é a ampliação da produção e do consumo do etanol (BNDES, 2007).

Os preços estão liberados em todos os níveis da cadeia de comercialização e o etanol é vendido, anidro em mistura com a gasolina ou hidratado (Figura 2) para uso puro, nos quase 28 mil postos de distribuição de todo o território brasileiro. No nível do consumidor, os preços do etanol hidratado têm historicamente sido inferiores a 70 % do preço da gasolina (MACEDO; NOGUEIRA, 2004).

Figura 2 - Os Tipos de Álcool Etílico.



Fonte: ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009.

Com todo esse desenvolvimento ao longo dos anos o etanol desperta de modo crescente 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. Já que comparado aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, e de contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono (BNDES, 2007; PACHECO, 2011).

Dentre tantas vantagens, surge o incentivo ao uso de um combustível que agregue capacidade energética e adicionalidade ambiental, sendo esta, aparentemente a solução factível para atingir o desafio de reduzir a emissão dos gases, visto que o álcool combustível já demonstrou ser uma energia tecnologicamente viável, sendo que em um passado recente abastecia 90 % dos veículos no Brasil (JUNQUEIRA, 2002).

De fato, o álcool combustível apresenta vantagens ambientais. Desconsiderando-se o uso de catalisadores, o álcool é um combustível mais limpo do que seu substituto, a gasolina, pois possui menores fatores de emissão para poluentes de efeito local. Além disso, é proveniente de uma fonte renovável,

resultando em emissões líquidas de gases precursores do efeito estufa potencialmente nulas, por seu conteúdo de carbono ser reciclado (LEME, 2004).

A utilização do etanol como combustível automotivo no país tem conferido a liderança no cenário internacional de sequestro de carbono e mitigação do efeito estufa. O Brasil é o maior produtor de etanol de cana no mundo, mas em produção total, fica atrás dos Estados Unidos, que usa o milho como matéria-prima e com forte expansão devido a possuir preços competitivos com os derivados do petróleo no mercado mundial. Porém, esse combustível pode ser produzido tendo como base qualquer outra biomassa com quantidades significativas de açúcares ou amido (SOUZA, 2011; FIRMINO; FONSECA, 2001).

Embora todo produto agrícola rico em carboidratos transformáveis em álcool (sacarose, glicose, amido, celulose, etc.) possa ser considerado matéria-prima para a fermentação alcoólica, é imprescindível considerar alguns pontos fundamentais, como condições de cultivo, custo aquisitivo, facilidade de transformação, rendimento em álcool, disponibilidade durante o ano, etc (COSTA, 2010).

A tecnologia de produção de etanol no Brasil está totalmente madura, permitindo ainda alguns ganhos de produtividade na área agrícola e poucos na área industrial. Existem variedades de cana geneticamente modificadas que permitiriam grandes reduções nos custos de produção, embora não possam ser utilizadas pela morosidade do processo de liberação (LEITE; LEAL, 2007).

É importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grande quantidade no país (COSTA, 2010).

A fermentação é realizada por meio de agentes biológicos (leveduras), que só permitem obtenção de etanol em baixas concentrações. Assim, é preciso, para uso energético, remover o excesso de água por destilação. Ocorre que, em decorrência de suas propriedades intrínsecas, é impossível separar o etanol da água, por destilação simples, quando sua concentração ultrapassa 96 % m/v.

A mistura com esse teor de etanol é conhecida como álcool hidratado. Através de etapas suplementares, é possível eliminar quase toda a água remanescente, obtendo-se etanol com cerca de 99,5 % de concentração, conhecido comercialmente como álcool anidro. Os dois tipos de etanol são utilizados como

combustível: o hidratado, nos motores a álcool e flexíveis, e o anidro, nos motores a gasolina, em proporção de até 25 % em volume (BNDES, 2008).

Quimicamente, o álcool hidratado não apresenta diferenças quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o etanol, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto (COSTA, 2010).

O Brasil encontra-se em uma posição favorável no que se refere à produção de etanol, por apresentar vantagens na tecnologia de produção, possibilidade de liderança na agricultura de energia e mercado de biocombustíveis sem ampliar área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos, diversidade de matérias-primas em diferentes biomas. Além disso, a matriz energética brasileira já é um exemplo de sustentabilidade, pois enquanto a média mundial é o uso de apenas 14 % de fontes renováveis, o Brasil utiliza 46,8 % (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2010; PACHECO 2011).

Para que sejam atendidas as expectativas dessa nova fase no uso do álcool combustível, é fundamental que sejam estabelecidas novas políticas. O fortalecimento do mercado interno deve fazer parte delas, por exemplo, através da expansão da adição de álcool anidro à gasolina; do incentivo à adoção de veículos de frota movidos a álcool; da ampliação das possibilidades de utilização do álcool em outras aplicações; da ampliação da penetração dos novos veículos bicombustível (*flex fuel*).

O mercado consumidor de etanol crescerá ainda mais, tanto nacional quanto mundialmente, em um futuro próximo, devido às legislações ambientais que obrigam o uso de biocombustíveis em meios de transporte, ao cumprimento das exigências do Protocolo de Kyoto, à mistura do biocombustível na gasolina e a disponibilização crescente de automóveis bicombustíveis (PACHECO 2011).

2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Desde os tempos mais remotos, o ser humano descobriu que poderia aproveitar reações que sucediam espontaneamente na natureza para tornar sua vida melhor e mais agradável. Dessa forma, passou a utilizar em seu benefício,

os efeitos surpreendentes e, durante muito tempo, inexplicáveis, dos processos fermentativos para conservar alimentos e preparar bebidas de grãos de cereais (AMORIM; LEÃO, 2005).

Foi Lavoisier em 1789, o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica. Entretanto coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação sobre a natureza desse processo, atribuindo as leveduras, como agentes causais e classificando como um processo anaeróbio, ou seja, a vida se manifestando na ausência de ar. A partir daí, e principalmente durante as primeiras décadas de 1900, as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (LIMA et al., 2001).

Nesse processo eram utilizadas bactérias somente para a fermentação de bolos e pães. Atualmente, porém, o processo fermentativo atinge a escala industrial, englobando tanto a produção de bebidas fermentadas quanto vários tipos de alimentos e principalmente a fabricação do etanol de cana-de-açúcar (CASADEI, 2012).

O termo “fermentação” pode apresentar diferentes significados dependendo do setor do conhecimento que o utiliza. No sentido mais amplo possível, a fermentação pode ser definida como todo processo natural no que microorganismos catalisam a conversão de uma dada substância em determinado produto (ALCÂNTARA; SWARNAKAR, 2007). Ou seja, a fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e CO₂, catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras *Sacharomices cerevisae*, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol um subproduto desse processo (LIMA et al., 2001).

Ainda hoje boa parte do etanol industrial é feita por meio da fermentação, onde se distinguem três fases: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação. Embora também possa ser obtido álcool etílico sinteticamente de fontes como o eteno derivado do petróleo, o processo mais importante no Brasil continua sendo a fermentação (BNDES, 2007; LIMA et al., 2001).

A agroindústria do álcool representa um considerável gerador econômico, sendo fundamental o conhecimento e constante melhoramento de todo

o processo, pois problemas podem surgir como a infecção bacteriana que pode causar danos tais como: consumo de açúcar; formação de goma; floculação do fermento; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio; e por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (AMORIN; OLIVEIRA, 1982).

Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo país. Sua distribuição geográfica, que encerra diversos climas e tipos de solos, permite seu cultivo em quase todo território e durante todo o ano (LIMA et al., 2001). Sendo assim, o novo conceito de etanol (ou bioetanol) corresponde a sua fabricação utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica.

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria - prima para obtenção de etanol, assim como sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar) e o conceito de biorrefinarias emergem como fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos (BNDES, 2007).

Os substratos (mostos) devem ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e à finalidade de sua atividade, que é produzir uma determinada substância. Além de uma composição capaz de suprir as exigências do microrganismo, para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA et al., 2001).

2.4 LEVEDURA

As leveduras que se encontram no grupo dos ascomicetos são denominadas fungos superiores, e considerados os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa, já que são os agentes mais largamente utilizados e economicamente viáveis. Porém, as bactérias entre as quais a *Zymomonas mobilis* são tidas também como capazes de produzir etanol, apesar de não serem tão utilizadas (PELCZAR et al., 1980).

Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo que alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas (COSTA, 2010).

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 (PATARO et al., 1998).

Assim, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em vários processos, como a produção de fermento de pão, extrato de levedura, cerveja, aditivos alimentícios (vitaminas, proteínas, enzimas), proteínas heterólogas (vacinas e outros componentes terapêuticos), e produtos de interesse farmacêutico através da manipulação de novas vias metabólicas e do aumento da produção com a engenharia genética, uma vez que o genoma de leveduras já foi inteiramente seqüenciado (BADOTTI et al., 2008).

Com essa gama de possibilidades a importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional baseada na produção de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, permitindo assim, continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo.

Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (SCP – single cell protein) e 600.000 toneladas de fermento de pão (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

Esse aumento de consumo de alimentos fermentados vem desde a década de 1970, e inclui alimentos como produtos lácteos (iogurtes, queijos, soro de leite), salsichas, bebidas fermentadas alcoólicas, vegetais, frutas, molhos, entre

outros. Um dos motivos do aumento do consumo é que estes alimentos são considerados naturais e saudáveis (COSTA, 2010).

2.5 *BUTIA ERIOSPATHA (MARTIUS) BECCARI*

As palmeiras se destacam tanto pelo recurso natural e econômico que representam às populações humanas, como pelo seu papel ecológico nas formações vegetais onde ocorrem. Seus frutos fazem parte da dieta de animais silvestres frugívoros, como canídeos, roedores e psitacídeos e vários estudos são realizados de sua biologia floral para o conhecimento sobre o sistema de reprodução, fluxo gênico e conservação das espécies (ROSA et al., 1998).

As espécies frutíferas possuem elevado valor, tanto para o comércio de frutas frescas como na produção de matérias-primas para a agroindústria. Além disso, são importantes fontes de alimento e de sustento para as populações de baixa renda em várias partes do país (JESUS, 2009).

Apresentam ainda ampla distribuição, ocorrendo principalmente na região equatorial e tropical, incluindo regiões subtropicais (LIMA et al., 2003). Entre as frutíferas nativas, uma família que merece destaque é a Arecaceae, que estão entre as plantas mais antigas do mundo, existentes há mais de 120 milhões de anos. Incluindo representantes como o açaí (*Euterpe oleracea*), o buriti (*Mauritia flexuosa*), a guariroba (*Syagrus oleracea*), o murmuru (*Astrocaryum ulei*), a pupunheira (*Bactris gasipaes*), a bacabinha (*Oenocarpus minor*), o tucumã (*Astrocaryum tucuma*) (LORENZI et al., 2004).

Estima-se que a fruticultura comercial envolva apenas vinte espécies, sendo que mais de 3.000 espécies não possuem utilização comercial (LORENZI et al., 2006). Estas espécies são praticamente desconhecidas do grande público e poderiam ser utilizadas não somente in natura, mas também no preparo de sorvetes, sucos, pastas, compotas, geléias, doces cristalizados e licores. Observa-se que há uma demanda cada vez maior no mercado internacional por frutas com novos aromas, sabores e texturas (SCHWARTZ et al., 2010).

Neste contexto, o Brasil destaca-se na produção de frutas tropicais, porém estas são pouco exploradas industrialmente por apresentarem períodos de maturação curtos e em específicos meses do ano. Os representantes desta família mais conhecidos no Sul do Brasil são os jerivás (*Syagrus romanzoffiana*), butiás

(*Butia spp.*) e juçaras (*Euterpe edulis*). O gênero *Butia* (Becc.) Becc. pertence à subtribo Butiinae, sendo amplamente distribuído no Brasil (em abundância no Sul, com algumas espécies ocorrendo no Centro-Oeste e Sudeste), Paraguai, Argentina e Uruguai, mas é pouco aproveitada nas indústrias por ser perecível e se deteriorar em curto período de tempo (MAGRO, 2006).

O butiazeiro produz frutos comestíveis com potencial de exploração da polpa, que pode ser consumida ao natural ou na forma de sorvete, suco, licor e doce. Possui em sua polpa (mesocarpo + epicarpo) teores consideráveis de vitamina C, e as folhas foram muito utilizadas para cobrir ranchos, fabricar cestas, chapéus e outras obras trançadas, ou para obter crina vegetal, de largo emprego em colchões e obras de estofaria. É uma palmeira (Figura 3) monóica, de estipe simples, com 3 a 5 metros de altura, folhas pinadas e com bainhas persistentes que cobrem grande parte do caule (REITZ et al., 1974).

Figura 3 - *Butia eriospatha* (Martius) Beccari.



Fonte: o autor.

As inflorescências apresentam flores unissexuadas na mesma ráquila e o fruto (Figura 4) é caracterizado como uma drupa oval comestível, formada por epicarpo amarelado, avermelhado ou arroxeado, mesocarpo carnoso e fibroso e endocarpo duro e denso com três poros germinativos, sendo funcional

apenas a quantidade de poros semelhante à quantidade de sementes do fruto, que pode ser de uma a três (REITZ, 1974).

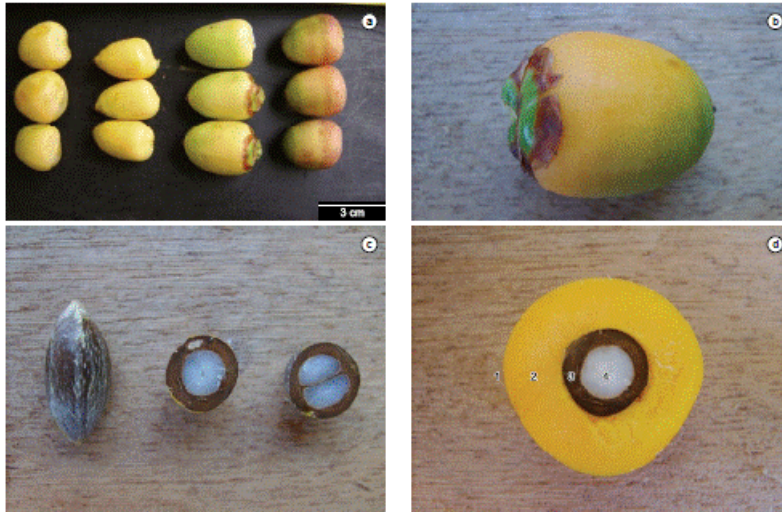
Figura 4 - Caracterização de diferentes partes e formatos de frutos de *Butia capitata* (Mart.) Beccari: a) frutos com diferentes formatos; b) um fruto; c) pirênio e corte transversal com uma e duas sementes; d) corte transversal do fruto (1- exocarpo; 2- mesocarpo; 3- endocarpo; 4- semente).



Fonte: MOURA, 2010

A maturação de frutos (Figura 5) geralmente ocorre de novembro a maio, tendo seu pico no verão, no mês de fevereiro (ROSA et al., 1998). Essa planta se desenvolve bem ao sol ou em locais pouco sombreados, estando presentes em diferentes ambientes, desde campo aberto até vegetação de restinga, ou associados à mata de araucária. Apesar de serem bastante conhecidas e exploradas para consumo de frutos e em paisagismo, há uma grande carência de informações científicas sobre estas espécies. O gênero *Butia* está sofrendo uma série de interferências antrópicas, absorvendo este impacto de tal forma a ser considerado em risco de extinção em áreas naturais (CORREA, et al., 2009).

Figura 5 - Maturação do fruto *Butia eriospatha* (Martius) Beccari.



Fonte: o autor

Além da monocultura, a criação extensiva de gado e a especulação imobiliária que são responsáveis por grande parte da redução das populações naturais de butiá. Conseqüentemente, o conhecimento e as tradições relacionadas à planta são também perdidos (BUTTOW et al., 2009).

De acordo com Lorenzi et al. (2004), o Butiá é um gênero pequeno de cerca de oito espécies da América do Sul, das quais sete ocorrem em território brasileiro. São plantas solitárias, acaules de caule subterrâneo, curto e grosso, moderadamente altas. As folhas geralmente arqueadas, com pecíolo e bainha indistintos. As inflorescências são interfoliaras, ramificadas com bráctea peduncular e geralmente lisa ou estriada superficialmente, em algumas espécies na parte externa, flores dispostas sobre a parte inferior das ráquulas em grupos de três, sendo a central feminina e a laterais masculinas.

Os frutos (Figura 6) são globulosos ou oblongos, amarelos ou arroxeados, de 1,8 a 4,2 cm de comprimento, de mesocarpo carnoso e adocicado, com endocarpo contendo 1 a 3 lóculos e provido de 3 poros próximos à sua porção mediana e semente com abundante endosperma, em geral oleaginosa (amêndoas) também são aproveitadas na fabricação de óleo comestível.

Figura 6 - Frutos de *Butia eriospatha* (Martius) Beccari.



Fonte: o autor.

Segundo Franco (1999), o butiá apresenta, em 100 g de polpa, cerca de 11,4 g de glicídios, 1,8 g de proteína, 1,5 g de lipídios, 23 mg de cálcio, 24 mg de fósforo, 40 mg de tiamina e riboflavina, além de ser boa fonte de vitamina C, apresentando 33 mg desta vitamina.

São relatados vários tipos de fruto, com variações no tamanho, na coloração e no sabor (BÜTTOW et al., 2006). Esta palmeira é popularmente conhecida como butiazeiro ou butieiro, fazendo parte do gênero *Butia*, que engloba as seguintes espécies: *Butia archeri*; *Butia capitata*; *Butia eriospatha*; *Butia microspadix*; *Butia odorata*; *Butia paraguayensis*; *Butia purpurascens*; *Butia yatay* (LORENZI et al., 2004).

A exploração comercial dos frutos de butiá, até o momento, apresenta pequena expressividade no mercado de frutas, pois os frutos comercializados são obtidos pelo extrativismo (SCHWARTZ, 2010). A fabricação de um fermentado alcoólico de butiá poderá ser uma boa alternativa para o aproveitamento de excedentes de safra. A comercialização visa minimizar o desperdício e desenvolver as agroindústrias regionais, colaborando diretamente para o crescimento econômico da região (ZINGLER, et al., 2009).

2.6 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Um recurso utilizado em estudos que envolvem variáveis possíveis de ser controladas no processo é a técnica de planejamento fatorial. O planejamento fatorial fornece suporte empírico para que a metodologia de superfície de resposta possa correlacionar as variáveis independentes com as dependentes por meio de um número mínimo de ensaios. Associado a análise de superfície de resposta, o planejamento fatorial permite fornecer informações confiáveis do processo e ao mesmo tempo minimiza o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX et al., 1978).

Utilizando a ferramenta do planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível investigar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre elas, bem como obter o valor das variáveis que otimizem os resultados (SANTOS et al., 2008).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística utilizada para a modelagem e análise de problemas nos quais a variável resposta é influenciada por vários fatores, cujo objetivo é a otimização dessa resposta. Baseia-se na variação simultânea de vários fatores (variáveis independentes), previamente selecionados por sua influência nas propriedades do processo (variáveis dependentes ou respostas). Utilizando técnicas matemáticas e estatísticas, os resultados experimentais indicam uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima (GRIZOTTO et al., 2005).

Ela também tem aplicações importantes em planejamentos, desenvolvimento e formulação de novos produtos, e melhoria dos projetos e produtos existentes. A mais extensiva aplicação do MSR é na área industrial, particularmente em situações em que entram várias variáveis que potencialmente influenciam em alguma medida de desempenho ou na qualidade característica de um produto ou processo. E, essa medida de desempenho ou qualidade característica é chamada de resposta (MYERS e MONTGOMERY, 1995).

A aplicação prática da MSR envolve necessariamente a construção de um modelo de aproximação para a melhor superfície de resposta. O modelo de aproximação baseia-se nos dados observados do sistema ou processo, constituindo-se no modelo empírico.

Em geral, assume-se, inicialmente, um modelo de regressão polinomial de baixa ordem (primeira ordem). Caso haja interação entre os fatores, pode-se aplicar o modelo mais completo o qual introduzirá curvatura à superfície de resposta.

3 JUSTIFICATIVA

Como alternativa para a produção de biocombustíveis busca-se diferentes matérias primas que tenham rendimento e viabilidade semelhantes à da cana de açúcar. Entre estas alternativas temos as palmeiras que possuem em seus frutos uma qualidade importante para a produção de etanol, a existência de açúcares que possibilitam a fermentação alcoólica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Otimização da produção de etanol do extrato aquoso da polpa do butiá utilizando a metodologia de superfície de resposta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Explorar o potencial da metodologia de superfície de resposta (MSR) para a aplicação no processo de fermentação alcoólica.

Aplicar métodos de otimização sem restrição, com base em modelos matemáticos empíricos gerados pela MSR.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COLETA DOS FRUTOS

Os frutos foram coletados de plantas nativas de *Butia eriospatha* (Martius) Beccari, no mês de janeiro no município de Laguna, situado na Região Sul de Santa Catarina, com localização em 28 °, 28 ' 54 ' de latitude sul e 48 °, 46 ' 56 ' de longitude leste, em uma altitude de 4 metros acima do nível do mar e vegetação diversificada típico da mata atlântica. O clima da região, segundo a classificação climática de Köppen, é sub-tropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 19,5 °C, verões relativamente amenos e chuvas bem distribuídas em todas as estações. Os frutos foram congelados e transportados em caixa de isopor para o laboratório de química da Universidade Estadual de Londrina-PR (PREFEITURA MUNICIPAL DE LAGUNA, 1982).

5.2 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DO BUTIÁ

Depois de colhidos, os frutos foram despolidos em um liquidificador de baixa rotação na proporção de 200 g de frutos de butiá em 50 mL de água destilada por batelada. Posteriormente foram separados fisicamente, com o auxílio de uma peneira, a polpa da fibra e do endocarpo e semente.

5.3 SUBSTRATO

Foi utilizado o extrato aquoso da polpa do butiá com pH de 3,5 e filtrado em tecido filtrante de algodão, sendo ajustado o seu pH com solução de hidróxido de sódio a 50 % para 4,5.

5.4 ANÁLISES

5.4.1 Cromatografia

A análise cromatográfica (Figura 7) foi realizada com equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) da marca SHIMADZU.

Figura 7 - Cromatografia Líquida de alta eficiência – Marca Shimatzu.



Fonte: o autor.

A seqüência de operações compreendeu o uso de Bomba LC-10AD, forno CTO-10A, detector de índice de refração RID-10A e integrador C-R6A, (Figura 8) em fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, forno na temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 48atm, a coluna para carboidratos utilizada foi BIO-RAD 87C (300 mm x 7,8 mm) sendo a fase móvel água ultra pura MILLI-Q. Foram utilizados padrões de glicose, sacarose, frutose e frutooligossacarídeos (FOS).

Figura 8 - Bomba LC-10AD, forno CTO-10A, detector de índice de refração RID-10A e integrador C-R6A.



Fonte: o autor.

5.4.2 Determinação de Açúcar Total

Para a determinação de açúcar total utilizou-se o método do fenol sulfúrico, em que 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).

5.5 LEVEDURA

Blocos de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (marca 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 aos ensaios estabelecidos pelo delineamento de mistura com restrições.

5.6 SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

Foi utilizado o extrato de levedura e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fonte de nitrogênio e fósforo. O $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) e ZnSO_4 ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) foram adicionados em todo o meio de cultura como fonte magnésio e zinco, respectivamente (CRUZ; BORZANI, 1980; CORDENUNSI et al., 1985; SILVA et al., 2006).

5.7 FERMENTAÇÃO

Foram utilizados erlenmeyers (125 mL) pré-esterilizados contendo meio de cultura suplementado. A fermentação foi com 2,0; 6,0 e 10,0 g L^{-1} de levedura inoculada. Os erlenmeyers (Figura 9) foram fechados com algodão hidrofóbico e incubados por 8 horas em temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ estabilizada em estufa. Após a centrifugação e interrupção da fermentação foi medido o teor de álcool.

Figura 9 - Erlenmeyers incubados na estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: o autor

5.8 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 10). O etanol é oxidado a ácido acético quando reage com dicromato de potássio (0,075 M) em meio sulfúrico a quente por 25 minutos a 60 °C.

Figura 10 - Microdestilador TE-012 Tecnal.



Fonte: o autor

O excesso de dicromato é titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal, após o resfriamento dos erlenmeyers, onde é adicionado o indicador ortofenantrolina. O teor de álcool ou a produção de álcool foi calculado em g L^{-1} , utilizando a equação 1, e para cálculo do rendimento utilizou a equação 2.

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

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

$$\% = (\text{Teor de álcool obtido (g L}^{-1}\text{)} \times 100) / \text{Teor de álcool máximo (g L}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

onde, teor de álcool máximo (g L^{-1}) é em relação ao valor de açúcar previamente determinado.

5.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para otimizar as condições de fermentação alcoólica do extrato aquoso de butiá foi utilizado o delineamento fatorial incompleto de Box-Behnken (3^3). Cada variável independente (X_1 , X_2 e X_3) foi transformada respectivamente em variável codificada (x_1 , x_2 e x_3), em três níveis de variação, com as restrições impostas apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis independentes e níveis de variação.

Variáveis independentes	Variáveis codificadas		
	-1	0	1
X_1 = Extrato de levedura (g L^{-1})	2,0000	3,0000	4,0000
X_2 = Levedura (g L^{-1})	2,000	6,000	10,000
X_3 = $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (g L^{-1})	0,2000	0,3000	0,4000

Fonte: o autor.

5.9.1 Modelo Matemático

A função utilizada foi do tipo (3):

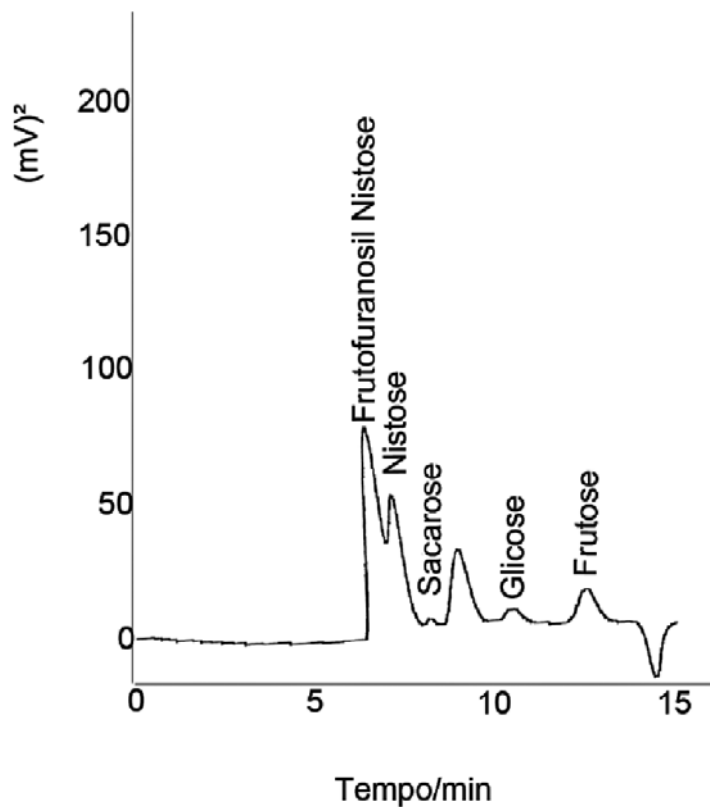
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^{j=1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Onde, Y representa a função resposta dos dados experimentais e x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes codificadas, correspondendo às concentrações de extrato de levedura, levedura e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, respectivamente, β os parâmetros estimados e ε o erro observado (STATISTICA, 2009).

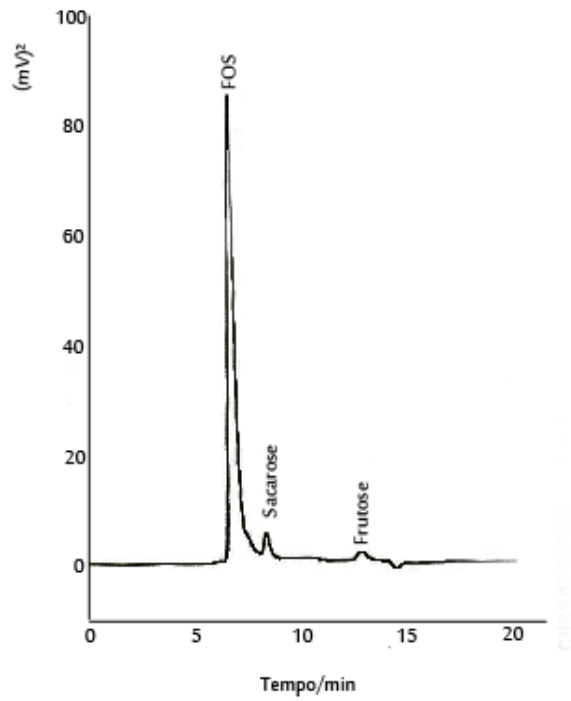
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato aquoso obtido do processamento dos frutos apresentou pH de 3,5, sendo corrigido para 4,5 com adição de hidróxido de sódio a 40 g L^{-1} pois, de acordo com Novaes et al. (1974) para um crescimento ótimo da levedura em relação à variação de pH, os limites estão entre 4,5 e 5,5. A concentração de açúcar total, determinada pelo método do fenol sulfúrico, foi de $91,2 \text{ g L}^{-1}$. Foram utilizados os padrões de FOS comercial (Figura 11), FOS PA (Figura 12), sacarose (Figura 13), glicose (Figura 14) e frutose (Figura 15).

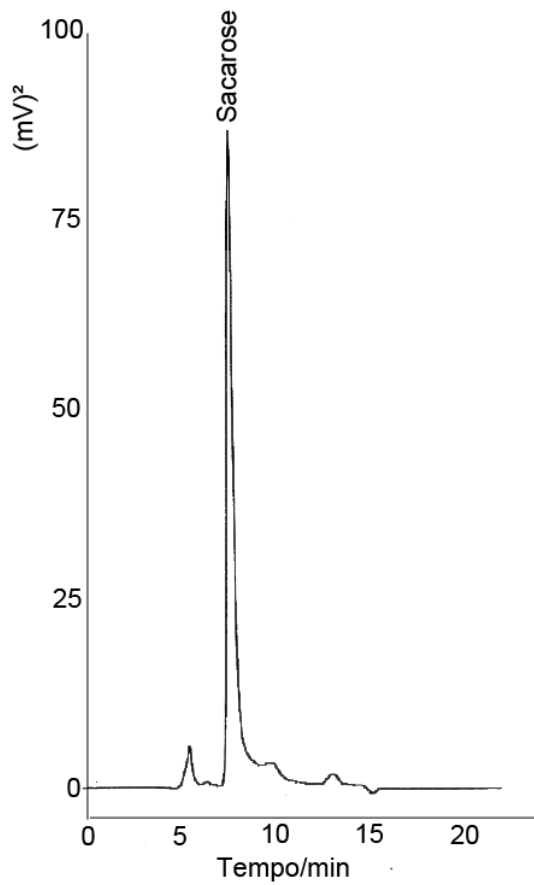
Figura 11 - Cromatograma do Padrão de FOS comercial.



Fonte: o autor

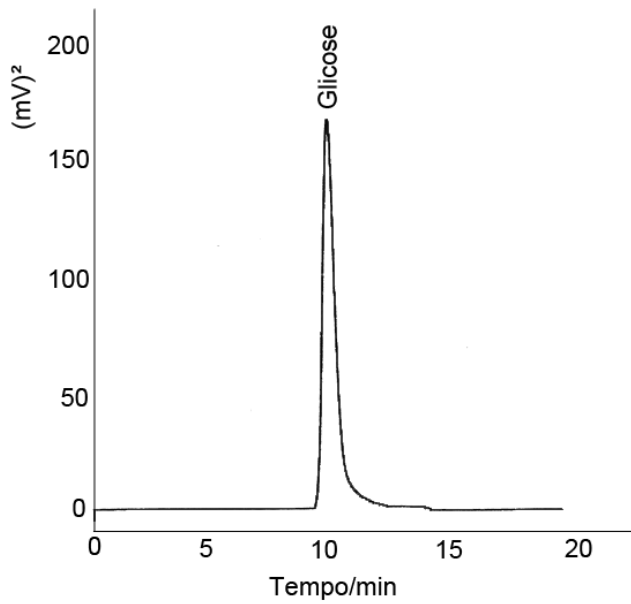
Figura 12 - Cromatograma do Padrão de FOS P.A.

Fonte: o autor

Figura 13 - Cromatograma do Padrão de Sacarose.

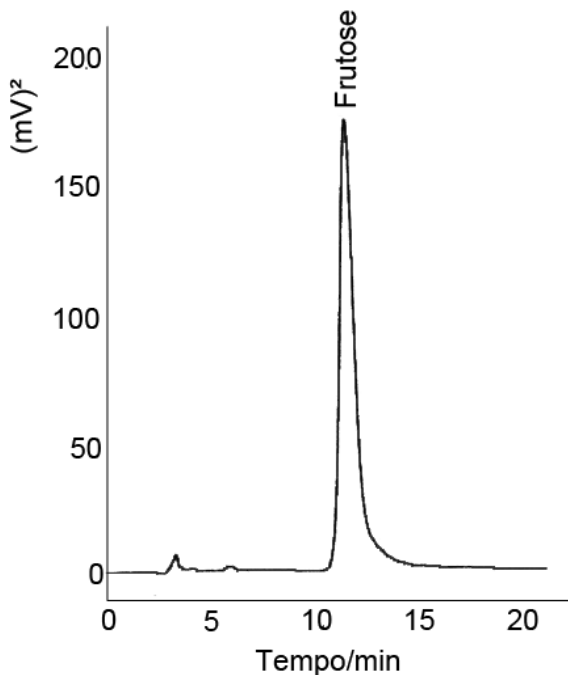
Fonte: o autor.

Figura 14 - Cromatograma do Padrão de Glicose.



Fonte: o autor.

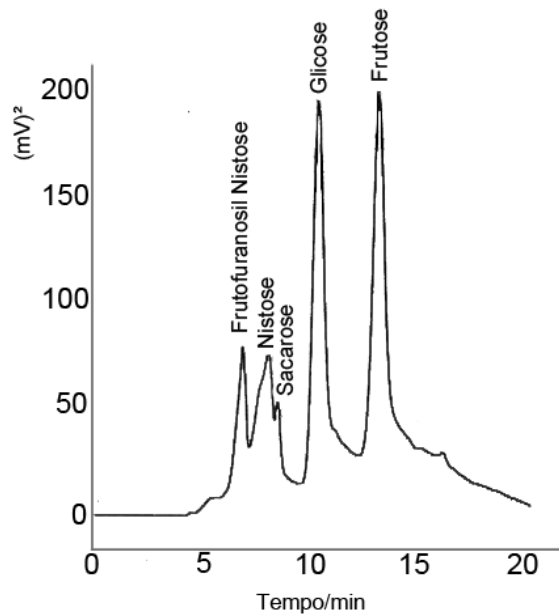
Figura 15 - Cromatograma do Padrão de Frutose.



Fonte: o autor

A análise cromatográfica (Figura 16) indicou que o extrato inicial apresentava $6,82 \text{ g L}^{-1}$ (7,48 %) de frutofuranosil nistose, $11,14 \text{ g L}^{-1}$ (12,21 %) de nistose, $3,43 \text{ g L}^{-1}$ (3,76 %) de sacarose, $29,97 \text{ g L}^{-1}$ (32,86 %) de glicose e $39,84 \text{ g L}^{-1}$ (43,69 %) de frutose como fonte de carboidratos.

Figura 16 - Cromatograma do extrato aquoso do Butiá inicial.

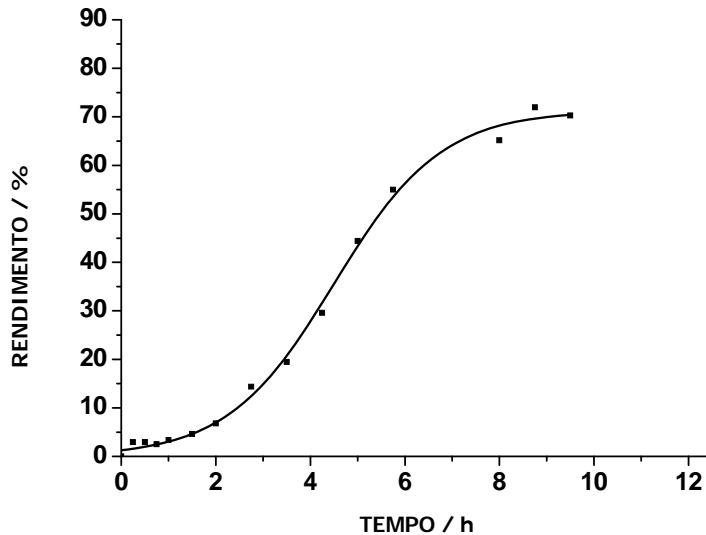


Fonte: o autor

Para determinar o tempo de fermentação, ensaios preliminares com o extrato da polpa de butiá contendo $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de levedura, $0,30 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, valores do ponto central do delineamento utilizado (Tabela 5) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) e ZnSO_4 ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) foram executados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pois, de acordo com Lima et al.(1975), leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 26 e 35°C .

A Figura 17 mostra aumento progressivo do rendimento da produção de álcool e a estabilização dos valores das respostas após 8 horas de fermentação. Os ensaios foram executados em estufa, com temperatura controlada e, durante todo o processo de fermentação não foi verificada variação significativa do pH.

Figura 17 - Rendimento da produção de etanol, em %, em função do tempo de fermentação. Os pontos representam os dados experimentais e a curva os dados ajustados.



Fonte: o autor

Para otimizar a fermentação alcoólica do extrato aquoso da polpa do butiá foi utilizado o delineamento fatorial 3^3 incompleto de Box-Behnken, totalizando 13 experimentos com duas repetições do ponto central para estimar a variância do erro (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

A Tabela 6 apresenta as variáveis independentes codificadas, os níveis de variação em valores originais e as respostas da produção, em g L^{-1} , e do rendimento, em %, expressas em valores médios de duas repetições dos ensaios de fermentação empregados, bem como as réplicas do ponto central que servem para estimar a variância do erro.

Tabela 6 - Nível de variação, variáveis independentes codificadas e produção de álcool, em g L⁻¹ e rendimento do processo de fermentação em %.

Ensaio	Variável codificada			Produção (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	-1	-1	0	34,39	73,79
2	1	-1	0	25,53	54,795
3	-1	1	0	27,87	59,805
4	1	1	0	30,02	64,42
5	-1	0	-1	28,55	61,275
6	1	0	-1	32,36	69,445
7	-1	0	1	32,16	69,01
8	1	0	1	32,75	70,27
9	0	-1	-1	24,16	51,855
10	0	1	-1	28,85	61,91
11	0	-1	1	24,56	52,705
12	0	1	1	32,45	69,645
13	0	0	0	36,27	77,84
14	0	0	0	37,38	80,22
15	0	0	0	35,32	75,79

Fonte: o autor

O modelo quadrático ajustado para o rendimento da fermentação alcoólica, contendo as variáveis independentes codificadas, em duplicata, está representado pela equação 4, onde os coeficientes de regressão foram obtidos por $\beta = (A'A)^{-1} A'B$, em que A é a matriz de delineamento contendo os termos lineares, quadráticos e de interação e B é o vetor resposta.

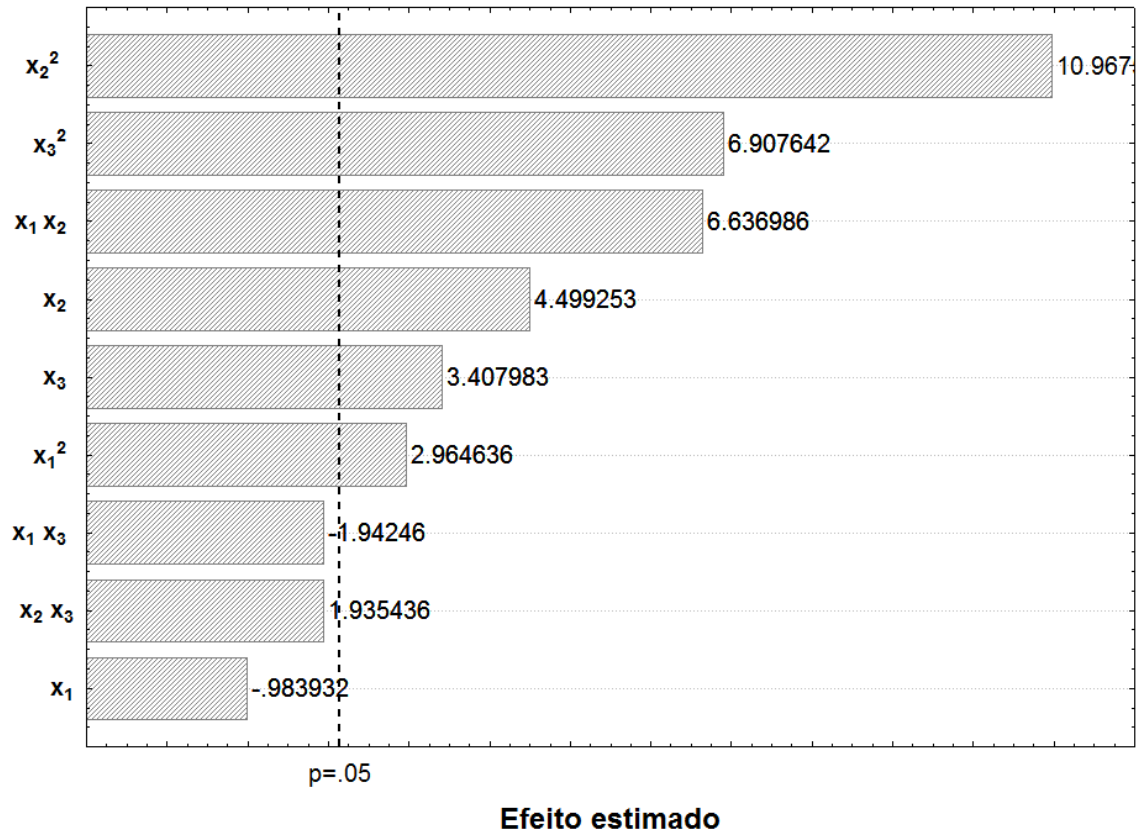
Na equação contendo apenas os termos significativos em nível de 5 %, Y representa a estimativa do rendimento da reação e, na forma codificada, x₁ representa a concentração de extrato de levedura, x₂ a concentração de levedura e x₃ a concentração de NH₄H₂PO₄. No modelo completo, apenas o termo linear do extrato de levedura (p= 0,3418) e da interação binária entre x₁ e x₃ (p= 0,07) e x₂ e

x_3 ($p= 0,07$) foram não significativos em nível de 5 % e, por isso, retirados da equação.

$$Y = 77,95 + 2,83 x_2 + 2,1431x_3 - 3,1381x_1^2 - 11,61 x_2^2 - 7,31x_3^2 +5,90 x_1x_2 \quad (4)$$

O gráfico de Pareto contendo todos os termos (Figura 18) mostra as variáveis mais significativas e a sua ordem de importância no modelo preditivo obtido. Os valores ao lado do retângulo representam a estatística do teste t.

Figura 18 - Gráfico de Pareto mostrando as variáveis mais significativas.



Fonte: o autor

A análise de variância (Tabela 7) indicou que o modelo proposto é significativo em nível de 5 % e o desvio da regressão é não significativo no mesmo nível de variação.

Tabela 7 - Análise de variância do rendimento da reação de fermentação alcoólica da polpa de butiá usando o delineamento fatorial incompleto 3^3 .

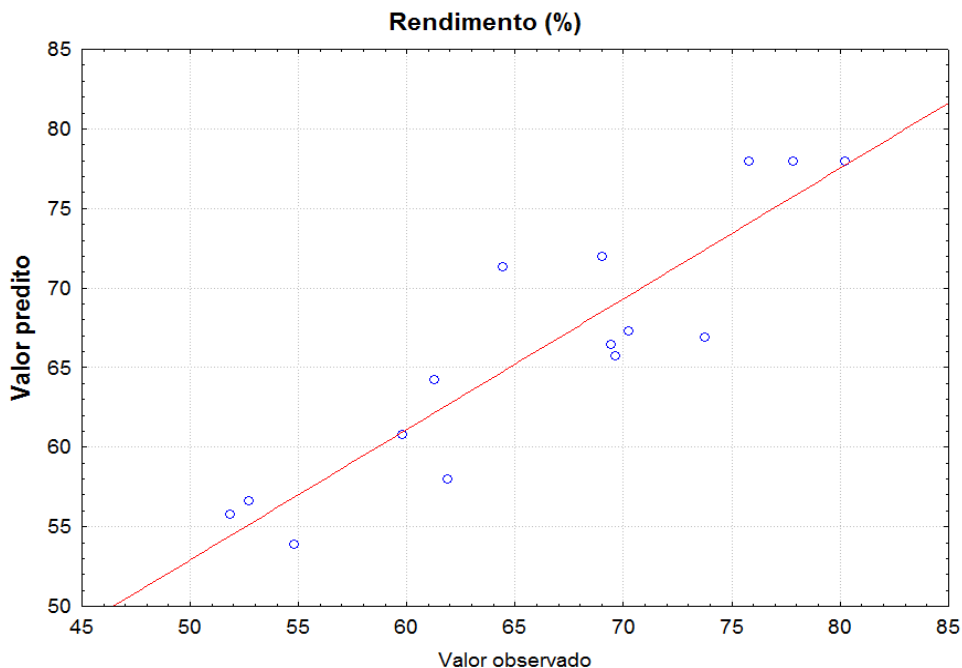
Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F _{calc}	F _{tab}
Regressão	9	929,586	103,287	21,01*	19.38
Desvio da regressão	3	193.757	64,586	13,14 ^(NS)	19.25
Erro	2	9,831	4,916		

*Significativo em nível de 5 % ; ^(NS) Não significativo em nível de 5 %.

Fonte: o autor

O valor do coeficiente total de determinação observado (R^2) foi de 82 %, que pode ser considerado adequado, 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 valor do R^2 mostram que a equação obtida, sem os termos não significativos, pode ser utilizada para fins preditivos, sendo adequada para os procedimentos de otimização. A Figura 19 mostra a distribuição dos valores experimentais em relação aos valores obtidos por meio da equação de regressão (4).

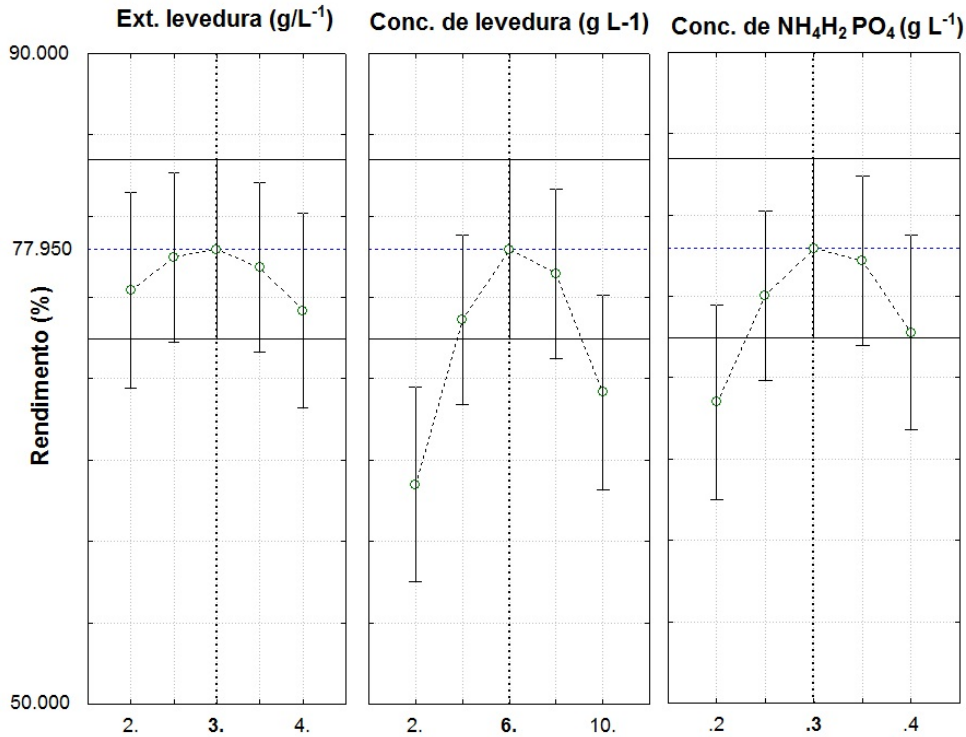
Figura 19 - Valores experimentais observados vs. valores estimados.



Fonte: o autor

A Figura 20 mostra a otimização das variáveis empregando o aplicativo Statistica 9.0 e que um rendimento de 77,95 % pode ser obtido quando se utiliza 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 6 g L⁻¹ de levedura e 0,3 g L⁻¹ de NH₄H₂PO₄.

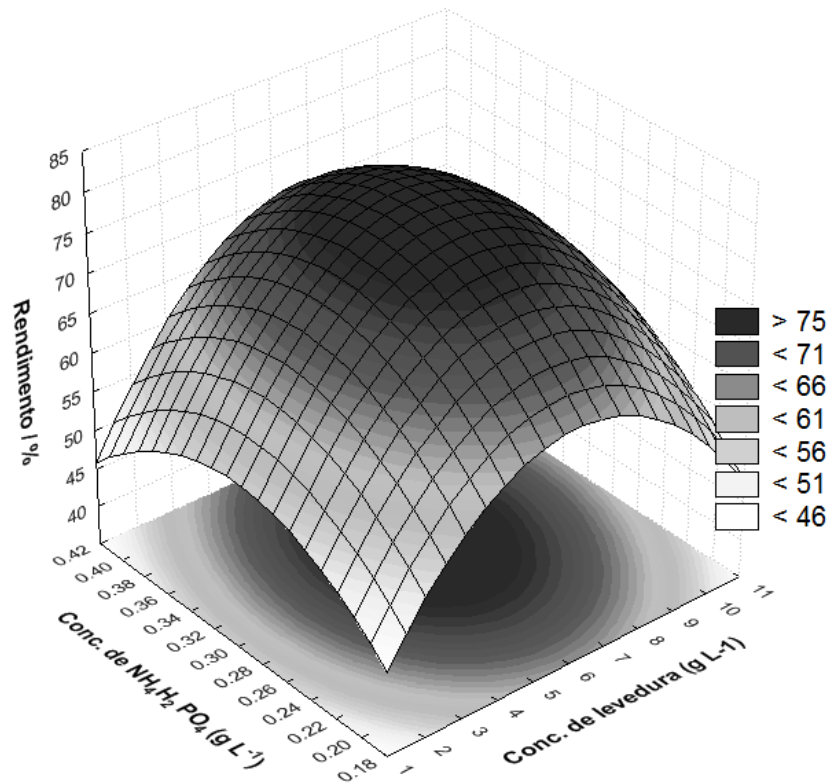
Figura 20 - Otimização das variáveis dependentes e independentes utilizando o aplicativo Statistica 9.0.



Fonte: o autor

A superfície de resposta da região de combinação binária entre as variáveis originais teor de NH₄H₂PO₄ (g L⁻¹) e de levedura (g L⁻¹) pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na figura 21. A Figura obtida 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 g L⁻¹ (Tabela 7). Com base na Figura 21 observa-se que a região ótima, para o rendimento da produção de etanol, situa-se próxima ao ponto central do delineamento experimental, fornecendo como resposta ótima estimada um rendimento de etanol superior a 75 %.

Figura 21 - Superfície de resposta para o rendimento da fermentação alcoólica, em %, fixando-se a concentração do extrato de levedura em $3,0 \text{ g L}^{-1}$.

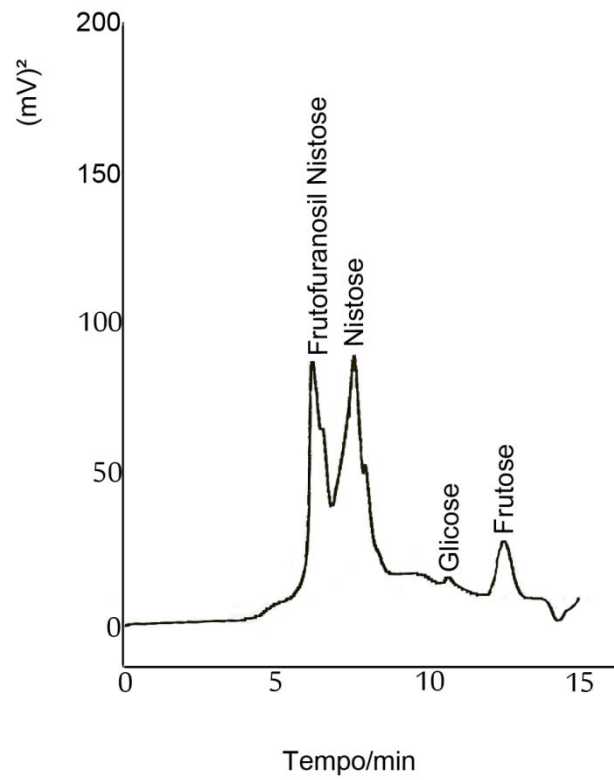


Fonte: o autor

A validação da equação preditiva foi realizada através da fermentação do extrato aquoso do butiá nas condições ótimas. O valor médio do rendimento, em triplicata, foi de 78 %. Aplicando-se o teste t, para amostra única, constatou-se que não houve diferença significativa, em nível de 5 %, entre este valor médio e aquele obtido na otimização que foi de 77,95 %.

A análise cromatográfica do produto fermentado (Figura 22), nas condições ótimas estabelecidas, mostrou que o FOS presente no extrato não sofreu fermentação e constatou-se ainda a presença de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de frutose, traços de glicose e ausência de sacarose.

Figura 22 - Cromatograma do extrato aquoso após a fermentação nas condições ótimas estabelecidas.



Fonte: o autor

7 CONCLUSÕES GERAIS

O extrato aquoso da polpa do *Butia eriospatha* (Martius) Beccari, na concentração obtida, se mostrou adequado e com potencial para a obtenção de etanol. A quantidade elevada de carboidratos, com uma concentração de 90 g L^{-1} e o rendimento na produção do álcool atingindo 78 %, indicam que pode ser utilizado como fonte alternativa na produção de álcool etílico, quando se aplica uma temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, extrato de levedura a $3,0 \text{ g L}^{-1}$, levedura a $6,0 \text{ g L}^{-1}$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a $0,30 \text{ g L}^{-1}$.

A modelagem utilizando a metodologia de superfície de resposta mostrou ser eficiente e relativamente simples como estratégia de otimização, podendo ser considerada de grande utilidade na pesquisa e desenvolvimento de processos de fermentação alcoólica.

8 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A abordagem empreendida nesse trabalho não se pretendeu exaustiva. Dessa forma, julga-se adequado uma continuação a essa pesquisa relativo à produção de etanol a partir do extrato aquoso do butiá, utilizando vários estágios da maturação do fruto para uma análise mais minuciosa.

O butiá, por ser espécie nativa de exploração extrativista, dispõe de pouca tecnologia de cultivo. Assim, pesquisas sobre técnicas de produção comercial são altamente relevantes.

Outros aspectos importantes para investigação e exploração referem-se à produção de Biodiesel a partir do óleo que se encontra dentro da amêndoa do fruto de *Butia eriospatha* (Martius) Beccari.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, S. R.; SWARNAKAR, R. Influência de variáveis do processo de fermentação acética contínua sobre o rendimento. In: **IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E V ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO**. Universidade do Vale do Paraíba, p. 260-263, 2007.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. In AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica**. Piracicaba: Editora Pancrom, 2005. p. 4-7.
- ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G; SOUZA, L. F. Programa do proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, Niterói, v. 11, p. 127-136, 2009.
- ANFAVEA: **Associação nacional dos fabricantes de veículos automotores**, 2009. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/tabelas.html>>. Acesso em: 29 Jun. 2013.
- BADOTTI, F. et al. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 4, p. 4-15, 2008.
- BARBOSA, A. M. et al. Extracellular beta-glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: Optimization using response surface methodology. **New Biotechnology**, Londrina, v. 27, p. 374-381, 2010.
- BRASIL. Banco nacional de desenvolvimento econômico e social. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro/RJ, n. 25, p 5-38, 2007.
- BRASIL. Banco nacional de desenvolvimento econômico e social. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro/RJ, n. 27, p 21-38, 2008.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Balanco energético nacional**. Brasília/DF: Empresa de Pesquisa Energética., 2010.
- BORSATO, D. et al. Otimização das condições de obtenção de biodiesel de óleo de soja utilizando o delineamento experimental de mistura. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n.1, p. 3-13, 2010.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters, an introduction to design, data analysis, and model building**. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons, p. 537, 1978.
- BÜTTOW, M. V. et al. Etnobotânica de butiá em Pelotas, Turuçu e Rio Grande. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO: IDEIAS, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2006, Pelotas/RS. **Anais do Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p. 95-98.

BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. Conhecimento tradicional associado ao uso de Butiás (*butia spp.*, arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal/SP, v. 31, n. 4, p. 1069-1075, 2009.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. 1ª ed. Rio de Janeiro/RJ: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2003.

CASADEI, M. E. **Processos fermentativos a partir de cana-de-açúcar**. 2012. 39f TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) - Tecnologia de Biocombustíveis. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba/SP, 2012.

CESAR, M. A. A. et al. Capacidade de fosfatos naturais e artificiais em elevar o teor de fósforo no caldo de cana-de-açúcar (cana-planta), visando o processo industrial. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.6, p.32-38, 1987.

CORDENUNSI, B. R. et al. A. Mathematical model for the alcoholic fermentation in batch culture: comparison between complete and incomplete factorial (3^3) designs. **Journal of Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 1-12, 1985.

CORREA, L. B. et al. Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal/SP, v. 31, n. 4, p. 1111-1116, 2009.

CORTEZ, L. A. B; LORA, E. E. S; GOMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Campinas/SP: Editora da UNICAMP, 2008.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando a obtenção de etanol**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL, 2010.

CRUZ, M. R. M.; BORZANI, W. Fermentação alcoólica de melão e de caldo de cana de açúcar por *Zymomonas*: ensaios preliminares. **Revista Brasil Technology**, São Paulo, v. 11, p. 51-57, 1980.

DONATTI, C. I. **Conseqüências da defaunação na dispersão de sementes e no recrutamento de plântulas da palmeira brejaúva (*Astrocaryum aculeatissimum*) na Mata Atlântica**. 2004. 102f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas). Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2004.

DUBOIS, N. et al. Colorimetric method determination of sugars and substances, **Analytical Chemistry**, Minneapolis, v. 23, p. 350- 356, 1956.

FIRMINO, F. G.; FONSECA, M. B. Uma discussão sobre os impactos ambientais causados pela expansão da agricultura: a produção de biocombustíveis no Brasil. **Essentia**, Paraíba, 2001. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT4-795-675-20080510155652.pdf>>. Acesso em: 14 Abr. 2013.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRIZOTTO, R. K. et al. Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 158-164, 2005.

GUSMÃO, R. H. **Avaliação do proálcool e suas perspectivas**. Sociedade de produtores de Açúcar e de Álcool. São Paulo/SP: Ministério de Minas e Energia, 1985.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, p. 351, 1995.

HILL, W. J.; HUNTER, W. G. A review of response surface methodology: a literature survey. **Technometrics**, Madison, v.8, n.4, p. 571-590, 1966.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **World Energy Outlook**. Paris: OECD, 2005.

JESUS, N. Mercado de venda por consignação de frutíferas. **Toda Fruta**, Jaboticabal/SP, 2009. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=9092>. Acesso em: 08 Jun. 2013.

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

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.

JUNIOR, R. J. S. M. **Obtenção do álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo**: validação de um processo em batelada. 2010. 146f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Maria/RS, 2010.

JUNQUEIRA, M. S. D. "Adicionalidade" ambiental do álcool combustível: um benefício ambiental verdadeiro ou somente mais uma matriz energética - um estudo do ciclo de vida deste combustível. **RAE-eletrônica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2002.

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

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos-CEBRAP**, São Paulo, v. 78, p. 15-21, 2007

LEME, R. M. Álcool combustível derivado da cana-de-açúcar e o desenvolvimento sustentável. **Proceedings of the 5th Encontro de Energia no Meio Rural**, Campinas, 2004. Disponível em <<http://www.feagri.unicamp.br/energia/agre2004/Fscommand/PDF/Agrener/Trabalho%20110.pdf>>. Acesso em: 22 Ago. 2013.

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

- LIMA, E. S. et al. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central/DF. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 298-305, 2003.
- LORENZI, H. et al. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2004.
- LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo/SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. p. 672.
- LOVELOCK, J. **Gaia - cura para um planeta doente**. São Paulo/SP: Editora Cultrix, 2007.
- MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. Avaliação da expansão da produção de etanol no Brasil, 2004. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**. Brasília/SP: Ministério de Minas e Energia, 2004.
- MAGRO, N. G. D. et al. Comparação físico-química de frutos congelados de *Butiá eriospatha* (Mart.) Becc do Paraná e Santa Catarina. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v.6, n.11. p.33-42, 2006.
- MEDINA, B. M. O. **Ecologia hoje – biocombustíveis**, Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <<http://www.biologo.com.br/ecologia/ecologia8.htm>>. Acesso em: 02 Set. 2013.
- MORAES, M. A. F. D. As profundas mudanças institucionais ao longo da história da agroindústria canvieira e os desafios atuais. **Economia Aplicada**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 555-557, 2007.
- MOURA FILHO, H. P. 120 Anos de produção mundial de açúcar: comentário sobre séries estatísticas tradicionais (1820-1940). **História Econômica & História de Empresas**, Rio de Janeiro, v.1, p.137-164, 2004.
- MOURA, R. C. et al. Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no norte de Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotroica, Minas Gerais**, v. 10, n. 2, p. 415-419, 2010.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2nd ed. New York: John Wiley Professional, 1995.
- NELSON, N. J. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 153, p. 375, 1944.
- NOVAES, F. V. et al. **I curso de extensão em tecnologia de aguardentes (apontamentos)**, 1974. 104f. Piracicaba/SP: ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, p. 104.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração? **Circular Técnica**, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>>. Acesso em: 04 Abr. 2013.

PATARO, C. et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in cachaça distillery. **Revista Microbiológica**, Minas Gerais, v. 29, p. 69-79, 1998.

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

PREFEITURA MUNICIPAL DE LAGUNA. Três séculos de brasilidade. In ALBA, J. L. D. **Três séculos de brasilidade**. Laguna: Prefeitura Municipal, 1982. p. 06-07.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M.; RENSBURG, P. V. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.

REITZ, R. Palmeiras. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí/SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974, p. 189.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia Capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (palmae) na restinga do município de laguna/SC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21. n 3, 1998.

SANTOS, S. F. M. et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Natal, v.10, p.101-109, 2008.

SCHWARTZ, E. et al. Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 736-745, 2010.

SILVA, J. A. et al. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 695-698, 2006.

SOUZA, S. P. **Produção integrada de biocombustíveis**: uma proposta para reduzir o uso de combustível fóssil no ciclo de vida do etanol de cana-de-açúcar. 2010. 144f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo/SP, 2010.

SOUZA, F. M. P. **O uso de biocombustíveis no Brasil e seu potencial de reduzir a emissão de gases de efeito estufa**. 2011. 67f. TCC (Trabalho de conclusão de curso)-Tecnologia de Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba/SP, 2011.

STATISTICA FOR WINDOWS. **Graphics software**. Tulsa, OK, USA, 2009.

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

SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 667-676, 2007.

TÁVORA, F. L. **História e economia dos biocombustíveis no Brasil**. Textos para Discussão 89, Senado Federal, Brasília/DF: Centro de Estudos de Consultoria do Senado Federal, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. 6 ed. Califórnia: Art Méd, 2002.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar (2009) **Dados e Cotações – Estatísticas**, 2009. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>>. Acesso em: 20 Março 2013.

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

ZINGLER, F. M. et al. Processo de fermentação alcoólica e caracterização do fermentado de butiá (*Butia eriospatha* Mart. Ex Drude). In: **VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2009. Uberlândia/MG, 2009, p.01-04.