

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE  
CURSO(MCC)**

**TÍTULO : “Avaliação da Hidrólise Ácida e Alcalina do Carço de  
Abacate para a Produção de Etanol”**

Orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

Orientado : Maurílio Gustavo Nespeca

BAURU - SP

DEZEMBRO / 2009

MAURÍLIO GUSTAVO NESPECA

**AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA E ALCALINA DO CAROÇO DE  
ABACATE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em Química, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP como requisito parcial para obtenção do título licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

BAURU-SP

2009

"O tempo inconstante transforma as coisas mais sem importância em elevadíssimas".  
(Sêneca)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à minha família que sempre me apoiou, não apenas financeiramente, mas em todos os aspectos. Sem ela, provavelmente não cursaria uma faculdade fora de minha cidade.

Sou grato ao meu orientador pela oportunidade de trabalhar com ele em um de seus projetos, pela sua atenção, paciência, conhecimentos e, especialmente, pela sua amizade.

E agradeço às amizades que construí ao longo destes cinco anos. Gabriel, que me ajudou muito neste trabalho (até lavou vidrarias!); Juliano, que tirou muitas dúvidas sobre a pesquisa; Toninho; Patrik; Woody; Orlandão; Frota; Maurício; Réggis; Pinke; Bruno; Zé; Mobs; entre outros amigos.

## RESUMO

A comunidade científica vem buscando novas matrizes de fontes renováveis para a produção de etanol. A semente de abacate possui cerca de 20% de amido de sua massa total. A hidrólise de amido resulta em açúcares fermentáveis por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo produto da fermentação é o etanol. O amido pode ser hidrolisado por ácidos, bases e enzimas. Estudos realizados anteriormente mostraram que a hidrólise enzimática produziu em média 26,01 litros de etanol por tonelada de semente. No presente trabalho, analisou-se a eficiência da hidrólise química anterior à enzimática e a consequência da utilização de sementes dormentes. Avaliou-se a variação do grau Brix em cada etapa de hidrólise e determinou-se a concentração de etanol produzido ao final do processo através da cromatografia gasosa. A hidrólise química seguida da enzimática mostrou-se ser eficaz produzindo até 61,8 L.ton<sup>-1</sup>. A utilização de sementes dormentes não foi significativa para o aumento do grau Brix. O caroço de abacate demonstrou-se ser uma fonte renovável alternativa para produção de etanol.

**Palavras-chave:** Semente de abacate; hidrólise ácida e alcalina; hidrólise enzimática; fermentação; produção de etanol.

## ABSTRACT

New patterns from replaceable sources have been searched by scientific community to ethanol produce. The seed of avocado has thereabout 20% of starch. The starch hydrolysis results fermentable sugars by *Saccharomyces cerevisiae*, and the ethanol is the major product of fermentation. The starch can be hydrolysed by acids, basis and enzymes. Previous studies showed that enzymatic hydrolysis can produce 26,01 liter of ethanol per ton of seed. At the present work, we analyzed the chemistry hydrolysis efficiency before the enzymatic hydrolysis and the use of dormant seed consequence. The Brix rate variation at each stage was evaluated and the ethanol concentration was determined with gas chromatograph technique. The chemistry hydrolysis with subsequent enzymatic hydrolysis was effective, producing until 61,8 L.ton<sup>-1</sup>. The use of dormant seeds wasn't significative to raise the Brix rate. The seed of avocado demonstrated to be an alternative replaceable source to ethanol produce.

**Key-words:** Seed of avocado; acid and alkaline hydrolysis; enzymatic hydrolysis; fermentation; ethanol production.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Regressão linear dos teores de umidade e de amido encontrados nos caroços dos frutos de abacate. As variedades como os valores plotados correspondem à Tabela 1 (TANGO, et al., 2004).....	12
<b>Figura 2.</b>	Microfotografia eletrônica dos grânulos de amido (LEHNINGER, 2002).....	13
<b>Figura 3.</b>	O dois polissacarídeos do amido, a amilose e a amilopectina (LEHNHINGER, 2002).....	14
<b>Figura 4.</b>	Representação do complexo de microfibrilas (FARABEE, M.J., 2002, modificado).....	15
<b>Figura 5.</b>	Polissacarídeos amido e celulose. (a) amido, ligação glicosídica do tipo ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) (b) celulose, ligação glicosídica do tipo ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) (LEHNINGER, 2002, modificado).....	16
<b>Figura 6.</b>	Complexo enzimático que degrada a celulose (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997, modificado).....	21
<b>Figura 7.</b>	Efeito da concentração de glicose na produtividade de etanol (PARAZZI, C., 2006).....	23
<b>Figura 8.</b>	Reator de inox com controle de temperatura (PASSARETTI, 2008).....	28
<b>Figura 9.</b>	Refratômetro de mão Q-767-2, utilizado para acompanhar a variação do grau brix (densidade da solução) durante o processo de hidrólise (PASSARETTI, 2008).....	30
<b>Figura 10.</b>	Fluxograma dos processos de hidrólise seguidos da fermentação alcoólica..	31
<b>Figura 11.</b>	Sistema de CG (a), injetor (b), headspace (c) (PASSARETTI, 2008).....	32
<b>Figura 12.</b>	Representação do sistema de cromatografia gasosa acoplado ao amostrador headspace (PASSARETTI, 2008).....	33
<b>Figura 13.</b>	Variação do grau Brix das amostras em cada processo de hidrólise.....	35
<b>Figura 14.</b>	Curva Analítica das amostras padrões de etanol.....	36
<b>Figura 15.</b>	Cromatograma de uma amostra com o tempo de retenção do etanol.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química em porcentagem das sementes de abacate analisadas de diferentes espécies. (TANGO, CARVALHO e SOARES 2004).....	11
<b>Tabela 2.</b> Condições cromatográficas empregadas para determinação de etanol presentes nas amostras fermentadas do caldo hidrolisado (PASSARETTI, 2008).....	33
<b>Tabela 3.</b> Variação do grau Brix após as hidrólises químicas e enzimáticas de sementes frescas, dormentes e dormentes induzidamente.....	34
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de etanol produzido após a fermentação alcoólica do caldo hidrolisado.....	37



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>1.1 Biomassa como alternativa ao petróleo.....</b>	<b>09</b>
<b>1.2 Produção de etanol a partir do caroço de abacate.....</b>	<b>09</b>
<b>1.3 Amido e celulose.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Hidrólise de amido e celulose.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Fermentação.....</b>	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Matéria-prima.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Hidrólise ácida e alcalina.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Hidrólise enzimática.....</b>	<b>28</b>
<i>3.3.1 Especificações das enzimas utilizadas.....</i>	<i>28</i>
<i>3.3.2 Etapas da hidrólise enzimática.....</i>	<i>29</i>
<b>3.4 Fermentação alcoólica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Avaliação dos teores de álcool.....</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Biomassa como alternativa ao petróleo**

É evidente que a economia mundial atualmente depende do petróleo, porém verifica-se uma grande instabilidade dos preços e do fornecimento devido à problemática geopolítica. O petróleo como fonte de energia não é renovável e suas principais fontes de extração estão localizadas em áreas de permanente conflito (CARVALHO, 2002). Assim a comunidade científica vem buscando formas economicamente viáveis de obtenção de fontes renováveis de energia.

A implantação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) na década de 1970 tornou o Brasil o primeiro país a adotar a bioenergia em larga escala. Nesta época, os preços do petróleo mais do que triplicaram e houve um risco de superprodução de açúcar podendo acarretar no declínio das margens de lucro do setor.

O Brasil pela sua imensa extensão territorial, associada às excelentes condições de seu solo, é um perfeito território para a produção de biomassa. Esta vem sendo focada como uma fonte alternativa de energia, uma vez que é um recurso renovável, fixa  $\text{CO}_2$  atmosférico através da fotossíntese e completa o ciclo do carbono (McKENNDRY, 2002). Além do mais, a queima de combustíveis fósseis possui um teor de enxofre e de particulados maior que os combustíveis originados da biomassa, sendo, portanto mais poluente que o etanol e o biodiesel (CHURIN & DELMON, 1989).

## 1.2. Produção de etanol a partir do caroço de abacate

O abacateiro é cultivado em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em 2004, o Brasil ficou em quarto lugar no *ranking* tendo produzido 173 mil toneladas em área de 12 mil hectares. O México é o maior produtor e exportador de abacate e a França, o maior importador. Assim, maior parte da produção brasileira é destinada ao mercado nacional (FRANCISCO & BAPTISTELLA, 2005).

A região brasileira em que há maior produção é a Região Sudeste, seguida pela Nordeste e a Sul. As diferenças nos rendimentos agrícolas entre os Estados devem-se, principalmente, às formas de cultivo, tratamentos culturais e diversidade de cultivares em função das preferências dos consumidores (FRANCISCO & BAPTISTELLA, 2005).

São conhecidas mais de 500 variedades, de três origens diferentes: a guatemalteca, a antilhana e a mexicana. Esta fruta, quando “verde”, possui o caroço envolvido por um tegumento espesso, carnoso e de coloração branca, e à medida que ela amadurece, este tegumento encolhe e adquire coloração marrom (BLEINROTH & CASTRO, 1992). As cultivares existentes apresentam frutos com as mais variadas formas, tamanhos e pesos, assim como, diferentes proporções de casca, polpa e caroço.

Segundo Maranca, 1978, a fruta contém vitaminas lipossolúveis como as vitaminas A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. É eficaz na prevenção e tratamento de algumas doenças como a hiperplasia prostática, câncer e distúrbios de colesterol (TANGO, *et al.*, 2004). As qualidades organolépticas, o valor nutritivo e a riqueza em vitaminas justificam a expansão do seu consumo (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

O óleo de abacate apresenta de 60 % a 84 % de ácidos graxos insaturados e tem como principais componentes os ácidos oléico, palmítico, linoléico e palmitoléico.

Devido o alto teor de óleos totais, podendo chegar a 2800 L ha<sup>-1</sup>, o abacate é uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel (JAKUBASZKO, 2006).

A tendência global do aumento do consumo e processo industrial do abacate problematiza o descarte dos caroços. Isto leva ao aumento de insetos e roedores além da perda econômica transportando-se os subprodutos da industrialização a áreas de depósito (FERRARI, 2004).

No trabalho realizado por Tango, Carvalho e Soares (2004) foi realizado um estudo das composições químicas dos caroços de 15 variedades de abacate. O teor de cada composto pode ser visto na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Composição química em porcentagem das sementes de abacate analisadas de diferentes espécies. (TANGO, CARVALHO e SOARES 2004).

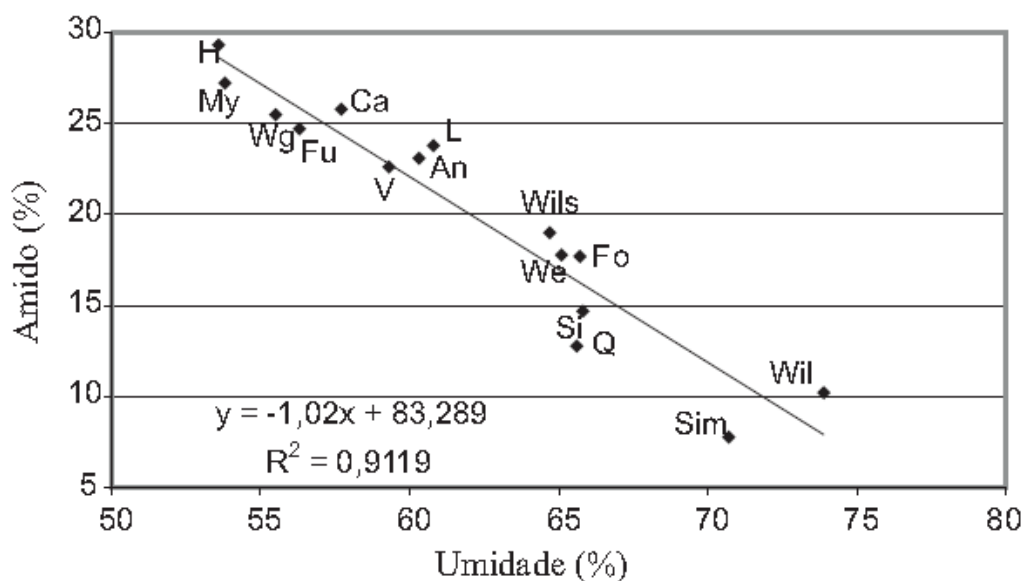
Variedades	Composição Química <sup>1</sup> (%)							
	Umidade	Resíduo Mineral	Lipídeos	Proteína Bruta	Fibra	Amido	Substâncias Fenólicas	Carboidratos <sup>2</sup>
Anaheim (An)	60,3	0,6	0,8	1,7	1,7	23,1	5,7	6,1
Carlsbad (Ca)	57,7	0,6	1,0	1,6	1,6	25,8	2,7	9,0
Fortuna (Fo)	65,7	1,8	0,7	2,1	3,1	17,7	3,8	5,1
Fuerte (Fu)	56,3	0,9	0,7	2,0	1,5	24,7	3,2	10,7
Hass (H)	53,6	0,9	0,8	1,6	1,6	29,0	3,1	9,1
Linda (L)	60,8	0,4	0,9	2,1	1,7	23,8	2,8	7,5
Quintal (Q)	65,6	1,1	1,0	2,3	1,8	12,8	3,8	11,6
Sinaloa (Si)	65,8	0,5	1,1	1,9	1,3	14,7	3,3	11,4
Vitória (V)	59,3	0,7	0,5	2,2	1,2	22,6	2,3	11,2
Wagner (Wg)	55,5	1,0	0,8	2,0	2,4	25,5	3,7	9,1
Westin (We)	65,1	0,5	0,6	1,9	1,4	17,8	3,3	9,4
Winslowson (Wils)	64,7	0,5	0,5	2,0	1,3	19,0	2,7	9,3
MÉDIA	61,9	0,8	0,8	2,0	1,7	20,1	3,4	9,3
CV (%) <sup>3</sup>	9,8	46,3	27,4	19	33,1	32,3	25,2	22,8

<sup>1</sup>Médias de 3 determinações Analíticas

<sup>2</sup>Nesses valores não estão incluídos os teores de amido e fibra; calculados usando a fórmula: (100% - soma dos demais componentes químicos).

<sup>3</sup>Menor ou maior coeficiente de variação indica menor ou maior variabilidade do componente analisado em relação ao germoplasma

Apesar de as variedades de abacate possuírem diferentes tamanhos e massas dos frutos e sementes, os teores de amido variam entre 7,8 % e 29,3 %, tendo 20,1 % como média geral. As sementes dos frutos das cultivares ricas em óleo nas polpas apresentaram teores de amido acima da média geral. Houve uma alta correlação linear negativa entre os teores de amido e de umidade encontrados nos caroços dos frutos (Figura 1).



**Figura 1.** Regressão linear dos teores de umidade e de amido encontrados nos caroços dos frutos de abacate. As variedades como os valores plotados correspondem à Tabela 1 (TANGO, et al., 2004).

O caroço de abacate pode ser uma fonte alimentícia para animais monogástricos se as substâncias fenólicas presentes forem extraídas com etanol devido à sua toxicidade (ICHIMARU et al., 1982).

Os carboidratos, como o amido e a celulose, presentes principalmente nas células das sementes dos frutos, podem ser hidrolisados enzimaticamente ou através de ácidos ou bases fortes e diluídos, formando açúcares fermentáveis por leveduras que metabolizam sacarídeos e excretam etanol como produto de seu metabolismo.

O teor de amido presente na semente do fruto mostra que sua utilização para produção de etanol torna-se viável, já que os grânulos de amido no caroço de abacate

apresentam tamanhos próximos aos grânulos presentes no milho, sendo este a principal matéria-prima na produção de etanol nos Estados Unidos (SILVA, 1995).

### 1.3. Amido e celulose

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, formados por um número elevado de monossacarídeos. Alguns homopolissacarídeos, polissacarídeos que contêm apenas um único tipo de unidade monomérica, servem como forma de armazenamento de monossacarídeos empregados como combustíveis pelas células, por exemplo, o amido (LEHNINGER, 2002).

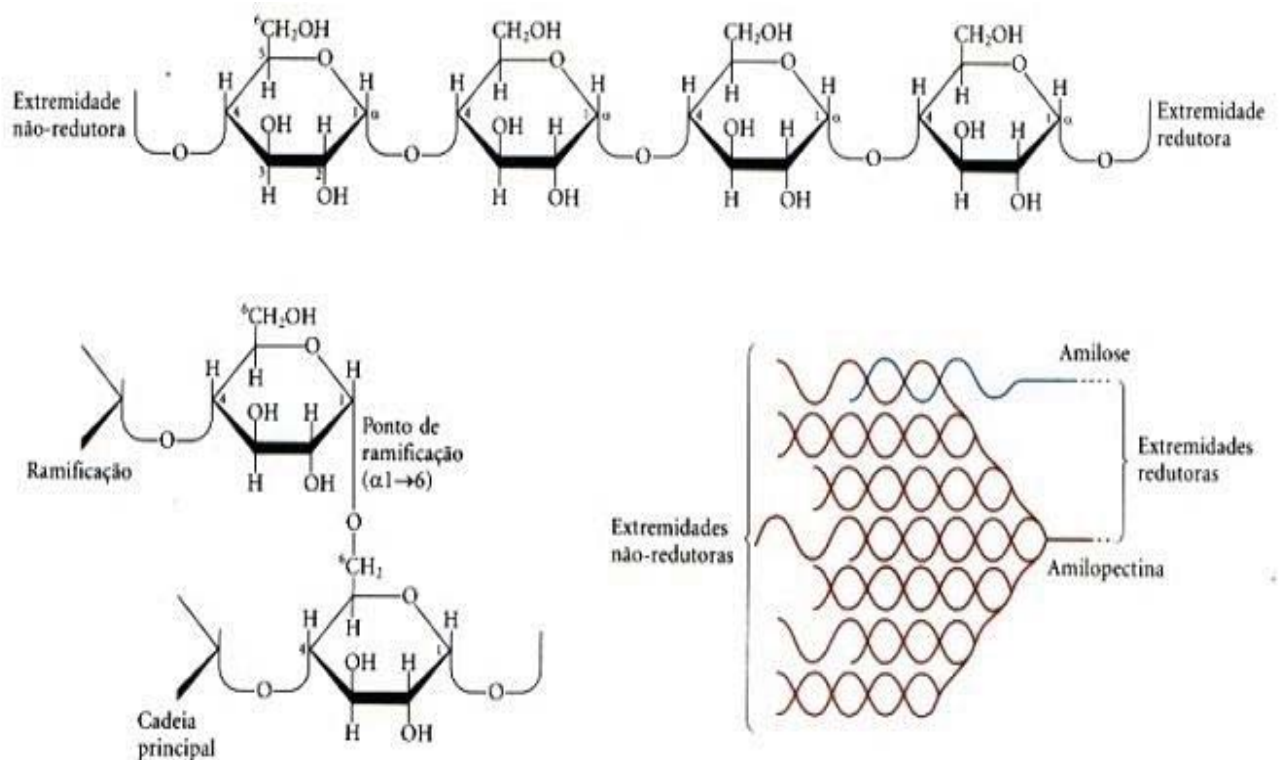
O polissacarídeo de armazenamento mais importante nas células vegetais é o amido que ocorre intracelularmente como grandes agregados ou grânulos. A maioria das células vegetais tem a habilidade de sintetizar o amido, porém ele é especialmente abundante nos tubérculos e nas sementes (LEHNINGER, 2002). Sua formação ocorre devido às atividades combinatórias de algumas enzimas tanto nas organelas fotossinteticamente ativas quanto nos amiloplastos de órgãos de reserva (FRANCO et al., 2001).



**Figura 2.** Microfotografia eletrônica dos grânulos de amido (LEHNINGER, 2002).

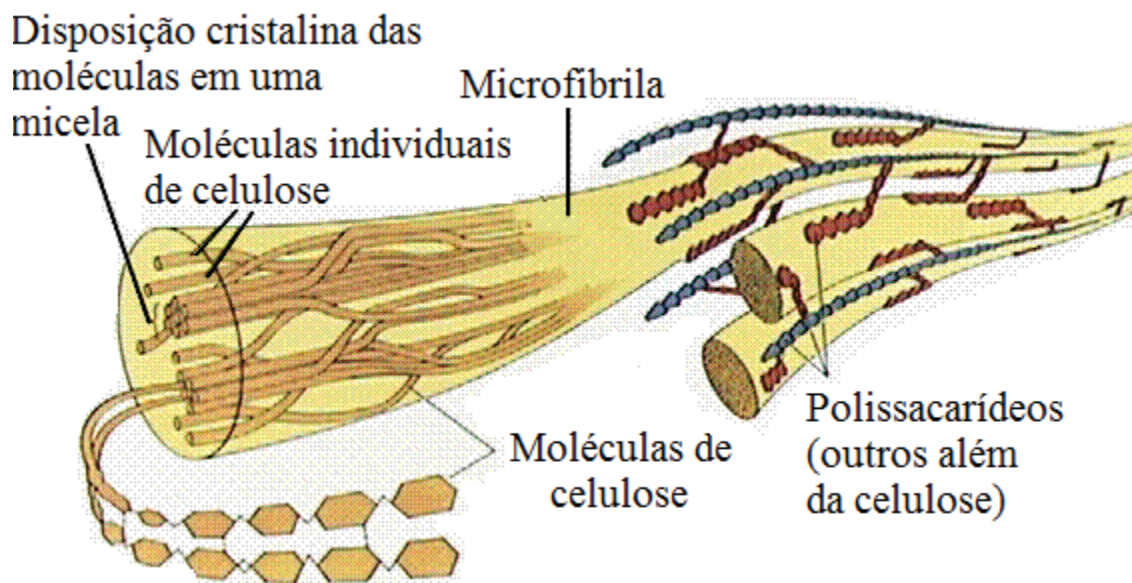
O amido possui áreas cristalinas com um alto nível de organização que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e os tornam mais ou menos resistentes aos ataques químicos enzimáticos. Já a zona amorfa dos grânulos é menos densa e mais suscetível aos ataques enzimáticos (BILIADERIS, 1991).

O amido é formado por dois componentes, a amilose e a amilopectina. A amilose é constituída por centenas de moléculas de D-glicose associadas entre si de forma não ramificada. A existência de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 confere à cadeia de amilose uma estrutura na forma de hélice. No caso da amilopectina, as cadeias principais são formadas por moléculas de D-glicose que formam ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, porém possuem pontos de ramificação que se ligam através ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (CARRAPIÇO, 2002). Essa característica a torna menos suscetível à ação de algumas enzimas do que a amilose (FRANCO et al., 2001)



**Figura 3.** O dois polissacarídeos do amido, a amilose e a amilopectina (LEHNHINGER, 2002).

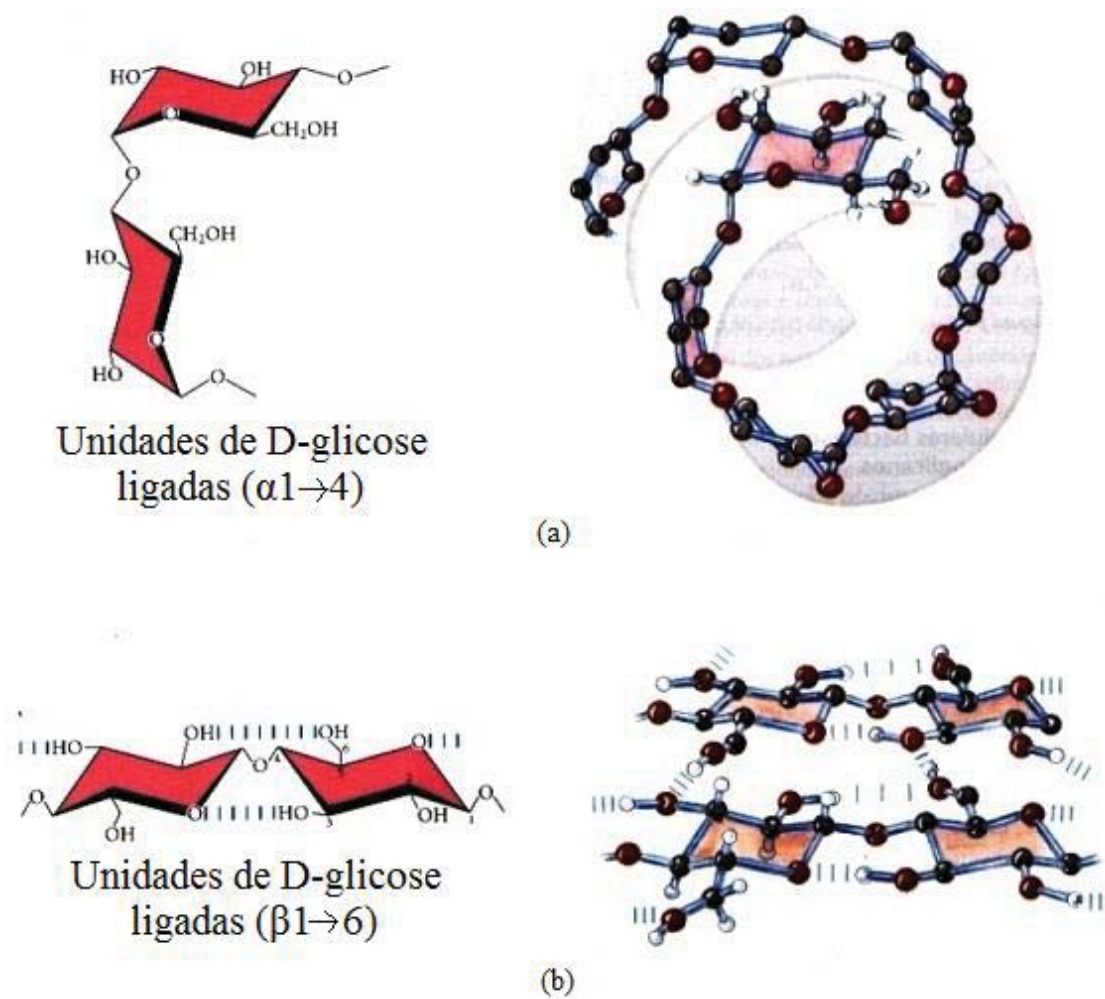
A celulose, principal constituinte das paredes celulares dos vegetais, também é um homopolissacarídeo, formado por unidades de D-glicose e não-ramificado, como a amilose. De acordo com Reid (1997), o grau de polimerização da celulose de parede primária varia de 2.000 a 6.000 resíduos de D-glicose. As moléculas de celulose se mantêm unidas por pontes de hidrogênio e outras forças não-covalentes formando microfibrilas, as quais estão embebidas numa matriz não-celulósica que contém uma mistura de outros polissacáridos: as hemiceluloses e as pectinas (CARRAPIÇO, 2002). As microfibrilas possuem alta resistência elástica, sendo pouco solúveis tanto em solventes aquosos como em orgânicos e resistentes a ataques de reagentes inorgânicos, como ácidos, ou orgânicos, como enzimas.



**Figura 4.** Representação do complexo de microfibrilas (FARABEE, M.J., 2002, modificado).

A diferença entre o polissacarídeo amilose e celulose é o tipo de ligação glicosídica. Na amilose a ligação é do tipo ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) enquanto na celulose é do tipo ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ). Essa diferença confere aos dois polissacarídeos estruturas tridimensionais e propriedades físicas muito diferentes entre si (LEHNINGER, 2002).





**Figura 5.** Polissacarídeos amido e celulose. (a) amido, ligação glicosídica do tipo ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) (b) celulose, ligação glicosídica do tipo ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) (LEHNINGER, 2002, modificado).

#### 1.4. Hidrólise de amido e celulose

Para obter álcool a partir do amido é necessária uma hidrólise prévia de suas cadeias para adquirir glicose, pois o amido não é diretamente fermentável. A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática.

Os produtos do processo de sacarificação do amido vão de dextrinas de elevado peso molecular à glicose. A hidrólise da molécula de amido quebra progressivamente as ligações entre as moléculas de glicose gerando cadeias mais curtas de dextrinas; maltose e glicose (ZANIN et al, 2000).

Segundo Zanin e colaboradores, 2000, a hidrólise catalisada por ácidos industrialmente é mais comum o uso de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essa reação é conduzida em quantidade suficiente de água e é acelerada sob pressão e com aumento da temperatura do processo. Os ácidos não hidrolisam apenas o amido, mas também a celulose, que igualmente é formada por longas cadeias de glicose, havendo a produção de uma grande variedade de açúcares, porém alguns deles não são fermentáveis, como a pentose (BENEDETTI et al, 2009).

As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima no sítio ativo da mesma. A função das enzimas é diminuir a energia de ativação e assim aumentar a velocidade da reação. Como as enzimas são catalisadores, o equilíbrio da reação não é afetado. As enzimas não sofrem modificação durante a reação e ao final de cada ciclo voltam a apresentar a mesma atividade. Para que a atividade da enzima seja máxima, o pH da reação deve estar dentro de um intervalo característico de cada enzima, pois as cadeias laterais dos aminoácidos do centro ativo podem atuar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da manutenção de certos estados de ionização (LEHNINGER, 2002).

A degradação do amido de forma natural ocorre através de um complexo mecanismo enzimático, onde as enzimas envolvidas podem coexistir em múltiplas formas. As amilases, as fosforilases e as glicosidases atuam sobre o mesmo substrato, o amido, de maneira diferente, produzindo uma mistura de oligossacarídeos e açúcares solúveis (ROSSETO et al, 2004). As enzimas desramificadoras, que atuam nas ligações  $\alpha$ -1,6, podem liberar maltotriose, maltose e outros oligossacarídeos, fornecendo substratos para a atuação de outras enzimas, até açúcares solúveis, com geração de energia para a manutenção do fruto. De acordo com Koch (1996), o metabolismo de

carboidratos nas plantas tem um mecanismo complexo de sinalização envolvendo açúcares e hormônios capazes de controlar enzimas envolvidas na degradação do amido e acúmulo de sacarose.

A hidrólise enzimática tem sido bastante utilizada pelas indústrias na produção de álcool a partir do amido, pois as enzimas amilolíticas possuem alta especificidade e atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis acelerando as reações por ativação específica. A hidrólise do amido se dá por desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina, que, ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente glicose (TORRES, 2009).

Dentre as enzimas mais comumente utilizadas na degradação do amido, destacam-se a  $\alpha$ -amilase e a amiloglicosidase (ou glicoamilase). Estas duas possuem diferentes mecanismos de hidrólise atuando em diferentes tipos de ligação na molécula de amido.

A enzima  $\alpha$ -amilase bacteriana, utilizada na liquefação do amido para a produção de álcool entre outras aplicações, hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 da amilose e da amilopectina ao acaso, produzindo uma mistura de oligossacarídeos que pode ser hidrolisada pela amiloglicosidase formando-se glicose (ROSSETO et al, 2004).

Segundo Walker & Hope, 1963, na amilose, a hidrólise pela  $\alpha$ -amilase leva à formação inicial de maltose e maltotriose e, posteriormente, ocorre uma lenta hidrólise dos oligossacarídeos formando-se glicose e maltose como produtos finais. Contudo o produto final dependerá do tipo de amido e da origem da enzima (fúngica ou bacteriana).

Já na amilopectina, a ação da  $\alpha$ -amilase é restrita às ligações  $\alpha$ -1,6, obtendo-se glicose, maltose e dextrinas  $\alpha$ -limites (MARC & ENGASSER, 1987).

A  $\alpha$ -amilase de uso industrial é termoestável, com uma atuação na faixa de 90 a 110°C e pH 6,0. Todas as  $\alpha$ -amilases são cálcio-metaloenzimas havendo pelo menos um átomo de cálcio por molécula. Em presença de cálcio, as  $\alpha$ -amilases são mais resistentes a valores extremos de pH e temperatura (TORRES, 2009).

A amiloglicosidase é uma enzima sacarificante termoestável (55 - 60°C) em soluções acidificadas (pH 4,0 – 5,5) utilizada no processo de panificação, produção de xaropes de glicose e álcool (PIMENTEL, 1987). Esta enzima hidrolisa as ligações tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido. Entretanto, atua apenas nas extremidades não-redutoras e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose, portanto a ação da amiloglicosidase é lenta no ataque inicial em relação à amilose (FUJII et al., 1988).

Os produtos da hidrólise são glicose e pequenas quantidades de polissacarídeos (MARC & ENGASSER, 1987). A velocidade de hidrólise depende da extensão e do tipo da cadeia, se é linear ou ramificada. Assim, como a  $\alpha$ -amilase, a amiloglicosidase é mais ativa em cadeias longas do que curtas (FOGARTY & KELLY, 1980).

Monma et al., 1989, estudaram a ação simultânea da  $\alpha$ -amilase e da amiloglicosidase no processo de hidrólise em grânulos de arroz, sagu e batata e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos (TORRES, 2009).

A liquefação é um tratamento prévio à hidrólise enzimática, onde os grânulos de amido são aquecidos em solução aquosa, ocasionando a gelatinização e a hidrólise parcial e irreversível. A temperatura de gelatinização varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gelatinização (BEYNUM et al., 1985).

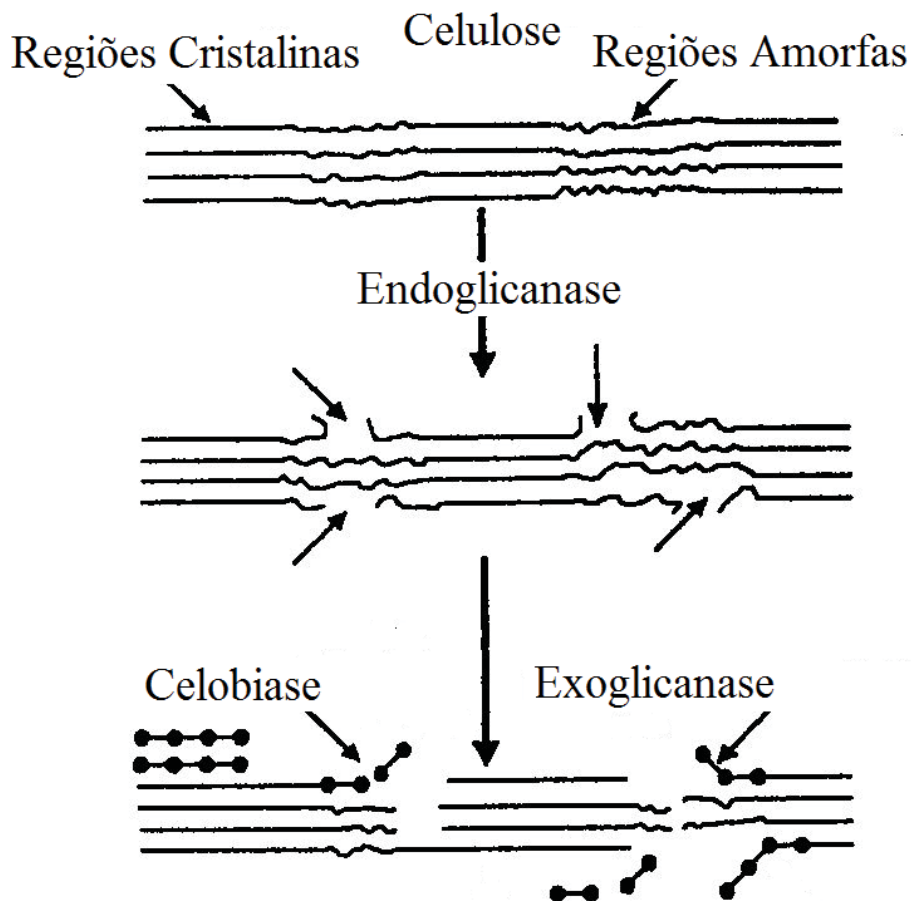
O processo de liquefação é o primeiro passo adotado em todos os processos industriais de produção de derivados de amido (TAFFARELLO, 2004). O aquecimento da solução de amido à temperatura de gelatinização resulta no inchaço da região amorfa do grânulo causando a abertura da lamela cristalina, tornando o amido altamente hidrolisado e passível de ataques enzimáticos (TORRES, 2009).

Os grânulos de amido estão no interior da célula vegetal protegidos de ataques químicos e enzimáticos pela parede celular formada de celulose. Além do processo de liquefação para tornar o amido mais suscetível à hidrólise, a ruptura da parede celular torna os grânulos de amido mais acessíveis aos ataques.

Assim, como o amido, a celulose pode ser hidrolisada por ácido ou enzimas resultando em açúcares fermentáveis. Na hidrólise ácida, o ácido precisa ser controlado para não levar a reações paralelas indesejáveis. A hidrólise enzimática, embora seja mais eficiente pela sua especificidade, ocorre a formação de inibidores.

De acordo com Robson (1989), nas fibras de celulose coexistem regiões de alta cristalinidade e regiões amorfas menos organizadas. Quanto maior for a proporção da forma cristalina, maior será a resistência ao ataque enzimático. Deste modo, o pré-tratamento do caroço de abacate com ácido, diminui a cristalinidade da celulose e permite sua deslignificação, facilitando o ataque enzimático posterior.

A celulase é um complexo enzimático utilizado na hidrólise da celulose que envolve três enzimas que atuam em temperaturas próximas de 50°C, na faixa de pH 5,0-6,0 e possuem ação bastante característica. A endoglicanase ( $\beta$ -1,4-glicanoglicanoidrolase) cliva a celulose ao acaso, possibilitando a formação de celotriose, celobiose e glicose. A exoglicanase ( $\beta$ -1,4-glicanocelobiohidrolase) atua na extremidade não-redutora da cadeia separando moléculas de celobiose. E por fim, a celobiase ( $\beta$ -1,4-glicosidase) hidrolisa a celobiose em glicose (REYES et al., 1998).



**Figura 6.** Complexo enzimático que degrada a celulose. Fonte: (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997, modificado).

Conforme Ladish e colaboradores (1983), a ação da celulase é heterogênea na hidrólise da celulose, pois o substrato sendo insolúvel em solução aquosa, as enzimas terão que dirigir-se à superfície onde poderão reagir depois de adsorvidas. Portanto, os efeitos difusionais são tão importantes quanto os cinéticos. Além do problema de difusão, a hidrólise pela celulase pode ser inibida por vários produtos solúveis originados na própria reação enzimática. A celobiose e a glicose foram identificadas como inibidores do complexo enzimático.

A hidrólise química (ácida ou básica) seria uma alternativa para auxiliar a hidrólise enzimática com o intuito de aumentar o rendimento de açúcares fermentáveis a partir do caroço de abacate, vendo-se que os processos enzimáticos possuem suas desvantagens e o fato de ácidos como o  $H_2SO_4$  e bases como  $NaOH$  serem de baixo

custo. Assim, uma análise da variação do grau Brix no processo de hidrólise seria de grande importância para avaliar a eficiência do ácido e da base e, se possível, a eliminação de uma etapa enzimática.

### 1.5. Fermentação

A fermentação da glicose é um processo completamente estabelecido já conhecido há milênios. A equação global da fermentação alcoólica de açúcares pode ser representada pela equação de Gay – Lussac:



Porém, além da formação destes produtos, a reação resulta em uma pequena quantidade de produtos secundários, como glicerol, ácido succínico e ácido láctico (TORRES, 2009).

Para ocorrer a fermentação é apenas necessária a adição de leveduras ao mosto e manter as condições adequadas de temperatura, pH e concentração de açúcares e microorganismos.

As leveduras são uma subclasse de fungos unicelulares de forma arredondada e incapaz de realizar fotossíntese. Esses organismos degradam moléculas mais complexas (carboidratos) à moléculas menores (etanol, gás carbônico, ácidos succínico e acético, glicerol, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, entre outros produtos) para obtenção de energia (BRAGA, 2006).

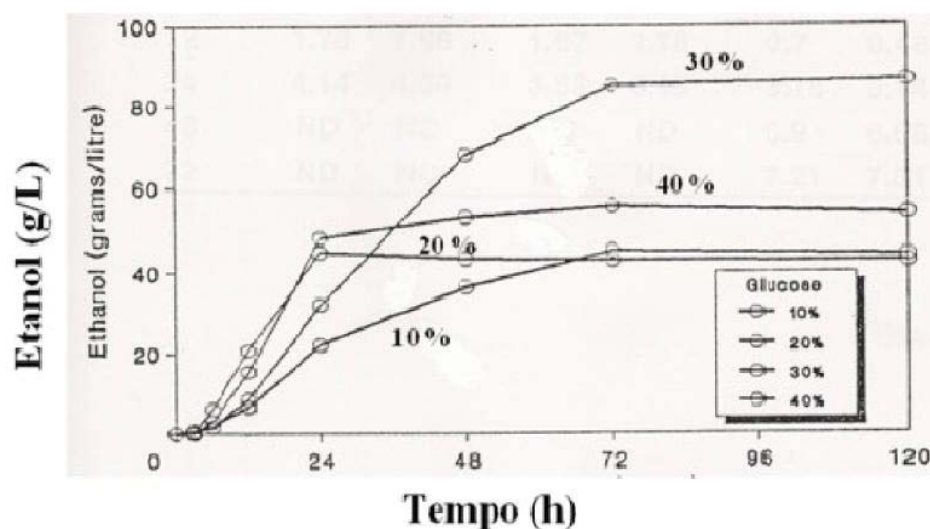
Esses fungos não são os únicos microorganismos capazes de produzir álcool, contudo, suas propriedades são mais adequadas ao processo de fermentação em escala industrial, pois são tolerantes a altas concentrações de álcool e CO<sub>2</sub>. Existem várias linhagens de leveduras, as cepas *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces*

*carlsbergensis* são as mais empregadas na fermentação industrial, apresentando maior tolerância a variações de pH, maior resistência ao álcool e maior rendimento da fermentação (ROSSELL, 2006).

O tempo de fermentação do mosto pode variar com a matéria-prima, o microrganismo e as condições de fermentação, podendo levar de dois a cinco dias. A fermentação estará completa quando não houver mais a liberação de gás carbônico no meio e os microorganismos estarem decantados no fundo do fermentador.

As temperaturas ideais para a produção industrial de álcool de amiláceo estão situadas na faixa de 26 a 35°C. O pH deve ser controlado entre 4,8 e 5,0 durante o processo de fermentação, com limites máximos entre 4,5 e 5,5.

O crescimento celular das leveduras e a formação do produto são influenciados pelas variações da concentração do substrato. Quando se aumenta a concentração de açúcares, a velocidade da fermentação e da produtividade é aumentada, há menor crescimento do microorganismo e menor formação de glicerol. Porém se o teor de açúcar for elevado, sucede-se um estresse osmótico da levedura, assim a faixa de concentração ideal para a fermentação está entre 15 e 25 °Bx, sendo a concentração limite na faixa de 25 a 30 °Bx.



**Figura 7.** Efeito da concentração de glicose na produtividade de etanol (PARAZZI, C. 2006).



Um dos desafios mais importantes a resolver no âmbito científico e tecnológico é a biotransformação das pentoses a etanol, pois a hidrólise da hemi-celulose fornece, além de hexoses (glicose, manose e galactose), pentoses (xilose e arabinose), as quais não são diretamente fermentáveis por leveduras industriais. Uma das alternativas propostas por autores para realização da fermentação de forma independente ou associada à sacarificação enzimática são a realização de um pré-tratamento e hidrólise ácida diluída com aproveitamento das hexoses e pentoses (ROSSELL, 2006).

O processo de hidrólise catalisada por ácidos não produz apenas açúcares provenientes da hidrólise às altas temperaturas e condições ácidas deste pré-tratamento. Uma série de compostos que são originados podem atuar como inibidores potenciais da fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do conteúdo percentual de celulose, hemi-celulose e lignina e das condições do processo (temperatura e tempo de reação).

Potenciais inibidores da fermentação produzidos na hidrólise são os derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos (DOMINGUEZ, 2003).

Os açúcares originados na hidrólise da hemi-celulose em altas temperaturas se degradam em compostos derivados do furano. O furfural, originado da degradação da xilose e arabinose, e o 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado a partir da degradação das hexoses (ROSSELL, 2006).

Matérias-primas que contêm uma percentagem maior de hemi-celulose, os hidrolisados apresentam uma maior concentração de furfural e ácido acético. Uma parte da lignina, durante o pré-tratamento, se degrada originando uma grande variedade de compostos fenólicos na forma de monômeros, dímeros e polímeros com uma grande variedade de substituintes podendo ser ácidos, aldeídos e alcoóis (ROSSELL, 2006).

Para aumentar o rendimento da fermentação do mosto após o pré-tratamento em altas temperaturas é possível aplicar métodos capazes de diminuir a concentração dos compostos inibidores da fermentação. Estes métodos se podem agrupar em: biológicos, químicos e físicos.

Os métodos biológicos consistem no emprego de microorganismos capazes de metabolizar alguns dos compostos inibidores presentes nos hidrolisados. Para eliminação de compostos como o ácido acético, o furfural e o ácido benzóico, faz-se um tratamento com o fungo *Trichoderma reesei*. É possível eliminar completamente os monômeros fenólicos empregando-se enzimas como a lacase e peroxidase procedentes de fungos lignolíticos (ROSSELL, 2006).

A remoção de ácidos alifáticos e aldeídos pode ser realizada através de métodos químicos, como a extração com solventes orgânicos de volatilidade relativamente elevada comparada a da água.

Compostos voláteis como o furfural, o ácido acético e o ácido fórmico podem ser extraídos simplesmente por evaporação e destilação.

O tratamento com hidróxido de cálcio dos hidrolisados ligno-celulósicos tem sido um dos métodos mais empregados para a eliminação dos compostos tóxicos às leveduras. O precipitado é extraído do meio antes da fermentação obtendo-se aumentos significativos no rendimento da fermentação (ROSSELL, 2006).

Para uma melhor produtividade de etanol é de grande importância a escolha da levedura, uma vez que a linhagem do microorganismo afeta de forma significativa o rendimento do processo. Portanto é considerável adquirir leveduras adequadas de empresas especializadas, comercializadas em pó ou em tubos com meio de cultivo. As leveduras comercializadas prensadas, facilmente obtidas no comércio, são selecionadas para a indústria de panificação, não sendo, então, específicas para a produção de álcool.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver novas tecnologias para a diversificação da produção de etanol, empregando-se o caroço de abacate como matriz.

Para tanto, avaliou-se:

- a) a hidrólise de sementes dormentes, frescas e dormentes induzidamente;
- b) a eficiência da hidrólise ácida e alcalina de sementes de abacate;
- c) o emprego de enzimas celulase,  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase após os processos de hidrólise ácida e alcalina;
- d) o rendimento na produção de etanol após o emprego da hidrólise ácida e básica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no presente estudo foram sementes de abacates de uma mesma espécie comprados em mercados na cidade de Bauru. Porém não foram levadas em consideração as variedades de abacate. Foram utilizadas sementes dormentes (3 meses), sementes frescas e sementes com dormência induzida.

Para induzir a dormência de sementes frescas, estas foram colocadas em uma estufa a 60 °C durante quatro dias.

#### 3.2. Hidrólise ácida e alcalina

Transferiu-se 500 g de sementes picadas de abacate a um liquidificador industrial com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M (hidrólise ácida) ou uma solução NaOH 0,1 M (hidrólise básica) e processou-se a solução durante 5 minutos (AZINI et al., 1987). A relação entre a massa seca da amostra e a solução foi de 1 g de semente para 10 ml de solução.

A solução triturada foi transferida e processada em um reator construído em aço inox com temperatura controlada a 95 °C durante 3 horas (**Figura 8**). Não foi realizado um sistema de refluxo, portanto adicionou-se água deionizada para manter o volume inicial da solução.



**Figura 8.** Reator de inox com controle de temperatura (PASSARETTI, 2008)

### **3.3. Hidrólise enzimática**

#### **3.3.1. Especificações das enzimas utilizadas**

##### **a) CELUBRIX®**

- Enzima: Complexo enzimático endoglucanas, exoglucanas e endoglucanases
- pH ótimo: 4,5 à 5,5
- Temperatura ideal: 40° C
- Concentração ideal: 0,50 mL L<sup>-1</sup> por Kg de substrato
- Fabricante: Novozyme A/S (Bagsvaerd, Dinamarca)

**b) AMILASE AG XXL®**

- Enzima:  $\alpha$ -amilase
- pH ótimo: 5 à 6
- Temperatura ideal: 85° C
- Concentração ideal: 1,00 mL L<sup>-1</sup> por Kg de substrato
- Fabricante: Novozyme A/S (Bagsvaerd, Dinamarca)

**c) TERMOMYL 120L**

- Enzima: amiloglicosidase
- pH ótimo: 5 à 6
- Temperatura ideal: 60° C
- Concentração ideal: 1,00 mL L<sup>-1</sup> por Kg de substrato
- Fabricante: Novozyme A/S (Bagsvaerd, Dinamarca)

**3.3.2 Etapas da hidrólise enzimática**

As temperaturas utilizadas no procedimento foram as mesmas utilizadas por Leonel e Cereda (1999), pois obtiveram bons resultados na hidrólise de mandioca utilizando as mesmas enzimas. A hidrólise enzimática foi realizada em três etapas. Em uma primeira etapa, após o pré-tratamento, diminuiu-se a temperatura mantendo-se a 42 °C e ajustou-se o pH em 5,5. Para o hidrolisado ácido adicionou-se uma solução de NaOH 5,0 M e para o básico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado. Acrescentou-se 10,0 mL do complexo enzimático celulase (CELUBRIX®) e agitou-se durante uma hora.

Na segunda etapa, manteve-se a temperatura a 95 °C em mesmo pH, adicionou-se 5,0 mL da enzima  $\alpha$ -amilase (AMILASE AG XXL®) e agitou-se durante uma hora. Para finalizar a hidrólise enzimática, resfriou-se o reator mantendo-se a temperatura a 60 °C, ajustou-se o pH a 4,5, adicionou-se 5,0 mL enzima amiloglicosidase (TERMOMYL 120L) e agitou-se por mais uma hora (PASSARETTI, 2008).

Ao fim de cada etapa, desde o pré-tratamento, mediu-se a variação do grau Brix do mosto empregando-se um refratômetro de mão Q-767-2 (**Figura 9 9**) para avaliar a eficiência de cada uma.

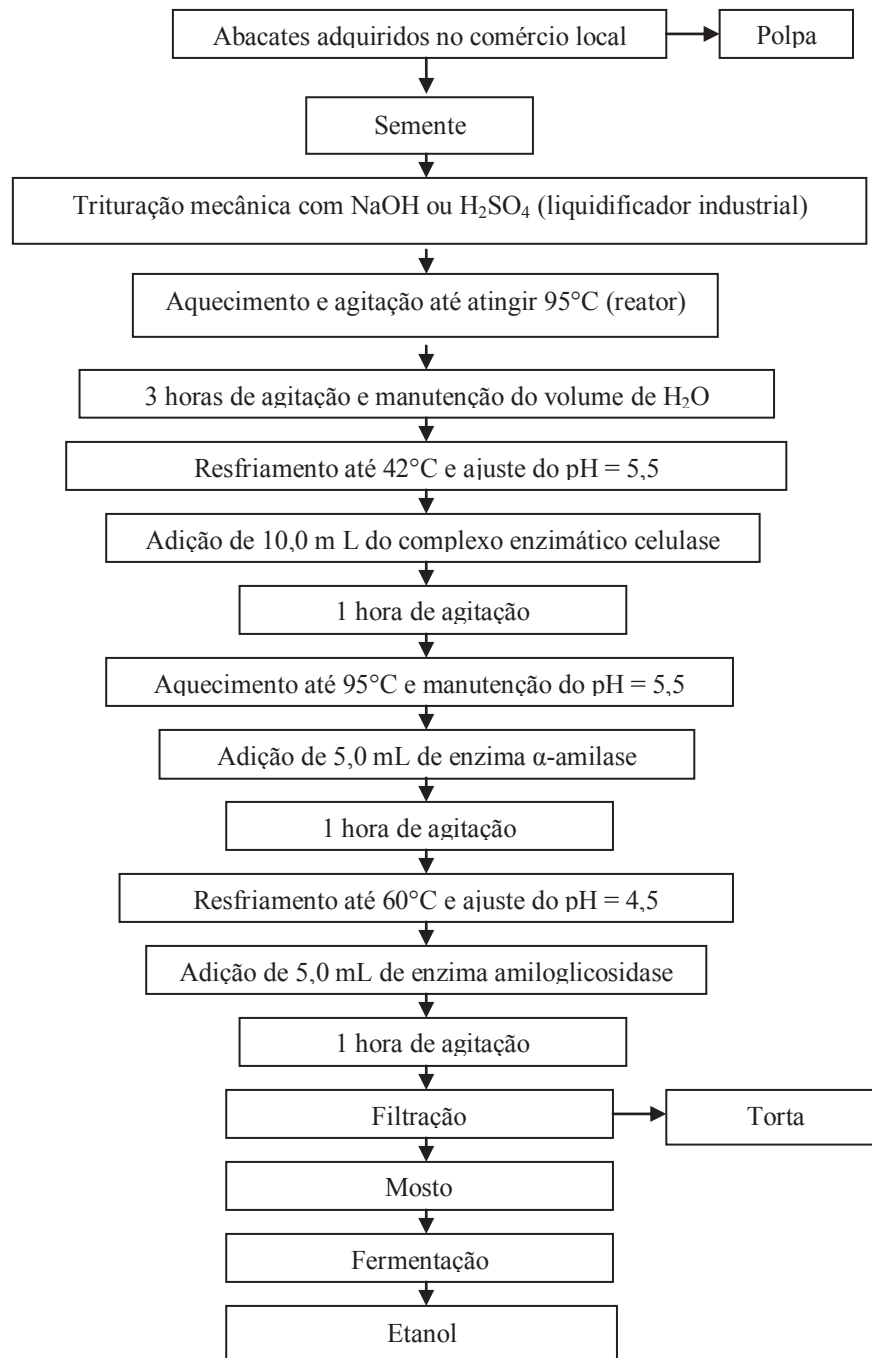


**Figura 9.** Refratômetro de mão Q-767-2, utilizado para acompanhar a variação do grau brix (densidade da solução) durante o processo de hidrólise (PASSARETTI, 2008).

### 3.4. Fermentação alcoólica

Após o processo de hidrólise, o mosto foi fermentado com cepas *Saccharomyces cerevisiae* de massa conhecida, a temperatura constante de 30 °C durante 72 horas aproximadamente.

Os processos de hidrólise seguidos da fermentação alcoólica estão representados na **Figura 10**.

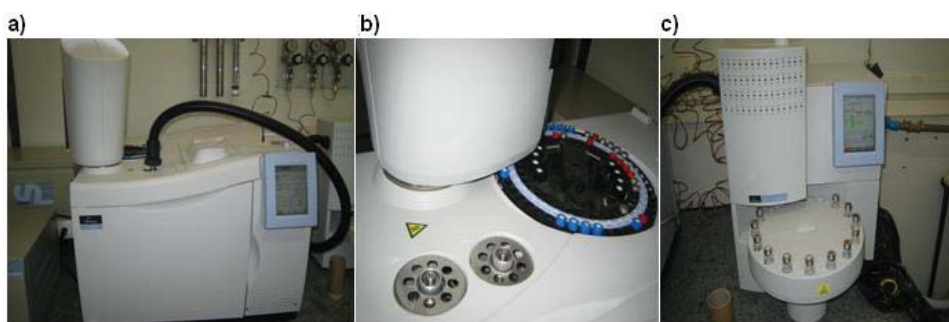


**Figura 10.** Fluxograma dos processos de hidrólise seguidos da fermentação alcoólica



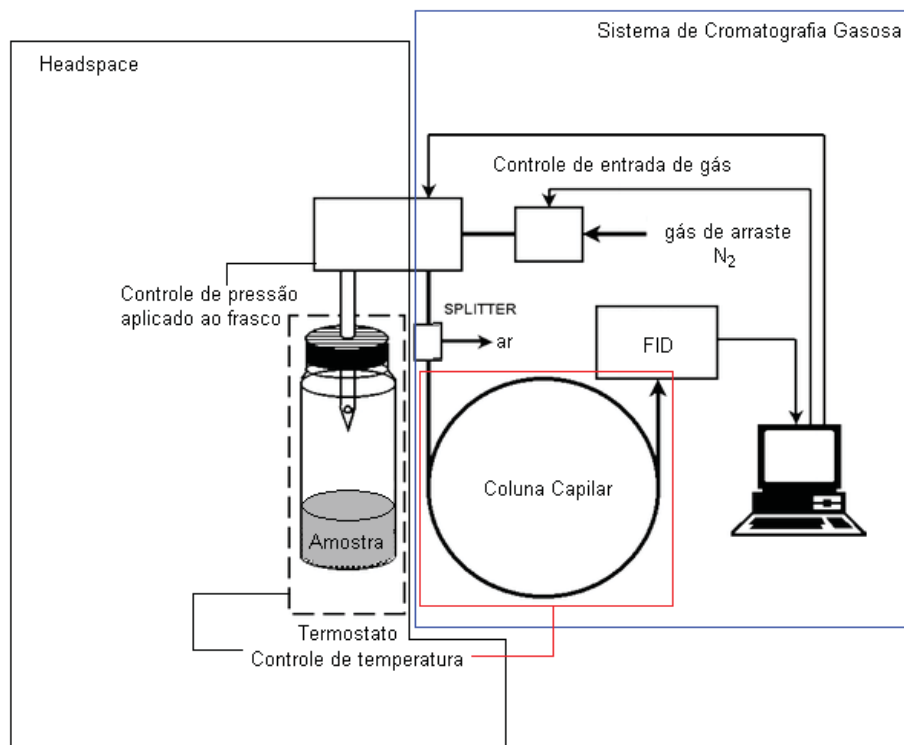
### 3.5. Avaliação dos teores de álcool obtidos após a hidrólise e fermentação do caroço de abacate.

A determinação dos teores de álcool foi efetuada por cromatografia gasosa, empregando-se um aparelho adquirido da Perkin Elmer, modelo Clarus 600 (**Figura11**). O procedimento realizado utilizou o Headspace segundo Kolb e Etre, 2006.



**Figura 11.** (a) Sistema de CG, (b) injetor, (c) headspace (PASSARETTI, 2008).

A utilização do Headspace possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo a gás para a determinação de compostos voláteis, como o álcool. A baixa detectabilidade dos detectores cromatográficos e a indesejável contaminação da coluna por resíduos não-voláteis tornam o Headspace imprescindível (PASSARETTI, 2008). Os parâmetros utilizados para o equipamento estão dispostos na **Tabela 2**.



**Figura 12.** Representação do sistema de cromatografia gasosa acoplado ao amostrador headspace (PASSARETTI, 2008).

**Tabela 2.** Condições cromatográficas empregadas para determinação de etanol presentes nas amostras fermentadas do caldo hidrolisado (PASSARETTI, 2008).

<i>Parâmetros cromatográficos</i>	
Equipamento	CG – Headspace - Clarus 600, Perkin Elmer
Coluna capilar	Elite Wax (30mm x 0,25mm x 0,25µm) polietileno glycol
Gás de arraste	Nitrogênio (1,0 mL min <sup>-1</sup> )
Modo de injeção	Split 1:20
Volume de injeção	1 µL
Deteção	Ionização de chama
Temperatura detector	300 °C
Temperatura injector	120 °C
Temperatura isotérmica	90°C/3min
<i>Programação de temperatura do <u>Headspace</u></i>	
Agulha	120°C
Temperatura de transferência	120°C
Temperatura do do forno	77 °C
Tempo de termostatização	20 min
Pressurização	20 psi/2min
Volume de injeção	10 µL

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

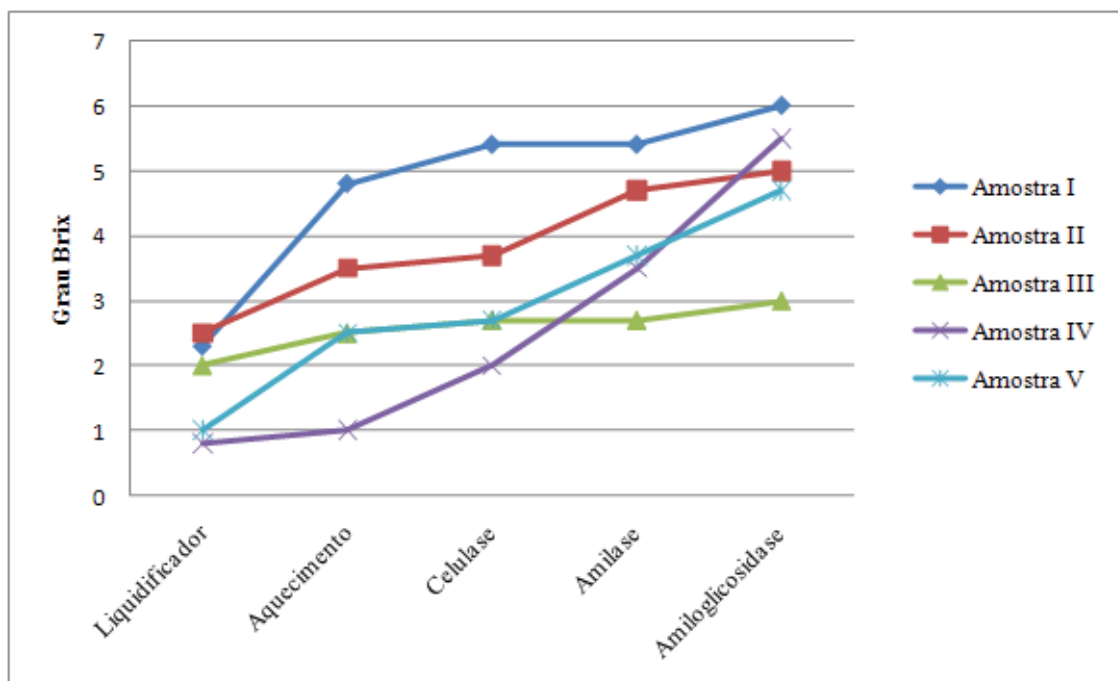
A partir da relação de 1:10 entre a massa de caroço em gramas e o volume de solução ácida ou básica em mL, analisou-se as variações do grau Brix em cada etapa de hidrólise. Os valores de grau Brix em cada etapa de hidrólise dos caroços de abacate estão dispostos na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Variação do grau Brix após as hidrólises químicas e enzimáticas de sementes frescas, dormentes e dormentes induzidamente.

Amostra	Semente	Pré-tratamento	°Bx (liquidificador)	°Bx (aquecimento)	°Bx (celulase)	°Bx (amilase)	°Bx (amiloglicosidase)
I	Fresca	Ácido	2,3	4,8	5,4	5,4	6,0
II	Dormente	Ácido	2,5	3,5	3,7	4,7	5,0
III	Dormência Induzida	Ácido	2,0	2,5	2,7	2,7	3,0
IV	Fresca	Base	0,8	1,0	2,0	3,5	5,5
V	Dormente	Base	1,0	2,5	2,7	3,7	4,7

Devido à degradação natural da semente, o amido é hidrolisado enzimaticamente para obtenção de energia, assim esperou-se que as sementes dormentes teriam um valor de grau Brix final maior que de sementes frescas e que a dormência induzida facilitaria a ação das enzimas utilizadas no processo de hidrólise. Porém, a partir dos resultados obtidos, observou-se o oposto do esperado. As sementes dormentes apresentaram valores finais de grau Brix menores que das sementes frescas, significando que suas hidrólises foram menos efetivas. O fato da degradação natural do amido poder produzir compostos secundários aos produtos desejados da hidrólise, estes compostos podem atuar como inibidores às hidrólises químicas e enzimáticas. Além disso, o mosto produzido a partir de sementes dormentes foi muito mais denso e com mais partículas insolúveis, o que ocasionou a dificuldade da filtração.

O pré-tratamento ácido apresentou-se mais eficiente que o alcalino e os valores finais do grau Brix das sementes hidrolisadas com ácido foram mais elevados. O gráfico da **Figura 13** representa a variação do grau Brix nas hidrólises de cada amostra.



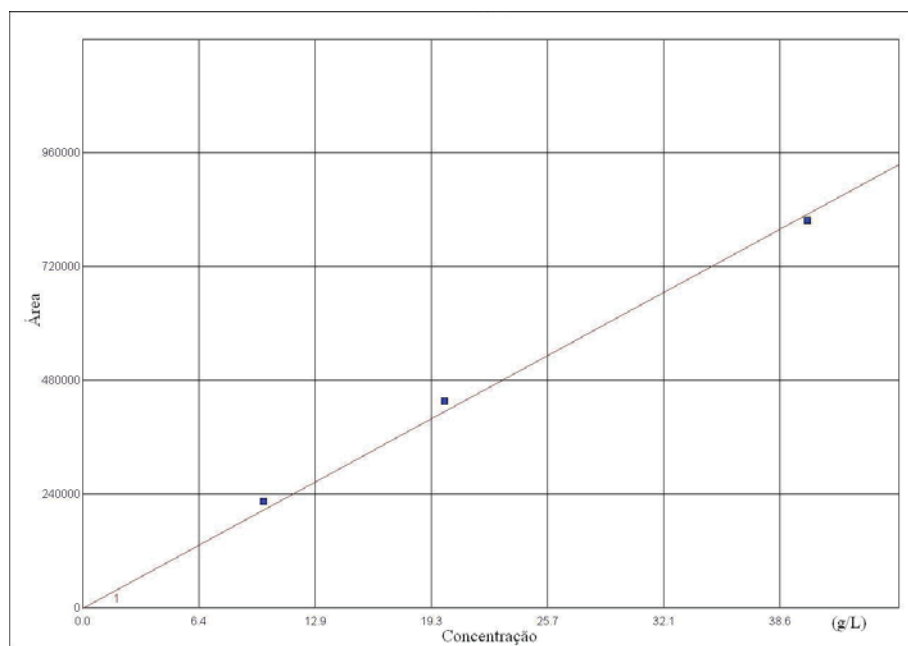
**Figura 13.** Variação do grau Brix das amostras em cada processo de hidrólise.

Notou-se que a variação do grau Brix nas hidrólises químicas com ácido foi mais acentuada que as com base, entretanto a variação nas hidrólises enzimáticas das amostras I, II e III foi menos intensa que das amostras IV e V.

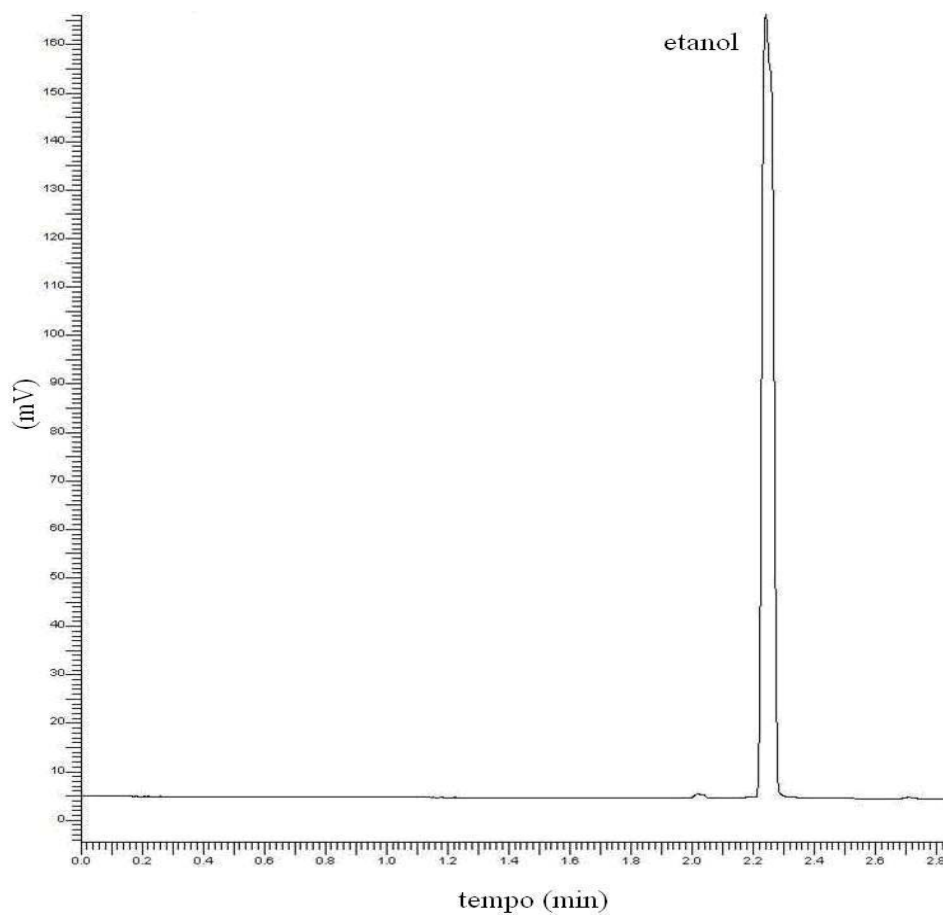
Após as hidrólises químicas, a hidrólise realizada pelo complexo enzimático celulase demonstrou-se muito pouco efetivo, a não ser para a amostra IV. E para as amostras hidrolisadas com ácido, a utilização de enzimas não se comprovou ser muito eficiente.

Depois do processo de hidrólise fermentação das amostras, determinou-se as concentrações de etanol através de um cromatógrafo gasoso acoplado a um Headspace para que não houvesse perda de etanol, utilizando-se a técnica de destilação fracionada.

A curva analítica está representada na **Figura 14** e o cromatograma de uma amostra com o tempo de retenção do etanol está representado na **Figura 15**.



**Figura 14.** Curva Analítica das amostras padrões de etanol



**Figura 15.** Cromatograma da Amostra I com o tempo de retenção do etanol em 2,3 min.

A massa de etanol determinada pela cromatografia gasosa de cada amostra fermentada está disposta na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Quantidade de etanol produzido após a fermentação alcoólica do caldo hidrolisado.

Amostra	°Bx final	Etanol resultante (g)	Volume de etanol (L) produzido por tonelada de semente
I	6,0	40,64	61,8
II	5,0	31,47	47,8
III	3,0	31,26	47,5
IV	5,5	23,56	35,8
V	4,7	21,94	33,3

O estudo realizado por Passaretti, 2008, cujas sementes de abacate foram hidrolisadas apenas enzimaticamente, apresentou uma média de 26,01 L de etanol produzido por tonelada de semente, significando que todas as amostras hidrolisadas quimicamente seguidas de hidrólise enzimática obtiveram uma maior produção de etanol.

Sabendo-se que o rendimento da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é de 85 litros de etanol por tonelada da matéria-prima. As sementes de abacate frescas hidrolisadas por ácido sulfúrico e por enzimas amilolíticas obtiveram um rendimento próximo da principal matriz brasileira, sendo apenas 1,37 vezes menor.

## 5. CONCLUSÕES

Pôde-se concluir a partir dos resultados obtidos neste trabalho que:

- a) As sementes dormentes obtiveram uma hidrólise menos eficiente;
- b) O emprego de enzimas amilolíticas não foi significativo na variação do grau Brix nas sementes hidrolisados por ácido. Entretanto, a variação foi elevada para as sementes que sofreram hidrólise alcalina;
- c) A hidrólise ácida e a alcalina da semente de abacate aumentaram o rendimento de etanol. E a ácida foi mais eficaz que a alcalina;
- d) Há necessidade de maiores estudos em relação à degradação natural da semente de abacate; à formação de compostos inibidores formados nas hidrólises químicas; e à possibilidade da eliminação da hidrólise pela celulase.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZZINI, A. et al. Produção conjunta de fibras celulósicas e etanol a partir do bambu. **Bragantia**, Campinas, 1987, v. 46, p. 17-25.

BENEDETTI, O.I.S et al. **Análise preliminar da produção de etanol a partir da celulose**. Engenharia Ambiental; Espírito Santo do Pinhal, 2009, v. 6, n. 2, p. 272-284.

BEYNUM, G. M. A.; ROELS, J.A. **Starch conversion technology**. In: Food Science and Technology. Marcel Dekker Inc. v. 14, 1985.

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 1991, v.69, p.60-78.

BLEINROTH, E.W.; CASTRO, J.V. Matéria-prima. In: ITAL **Abacate – cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas: ITAL, 1992. p. 58-148.

BRAGA, V.S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça**. Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP. 90f., 2006.

CARRAPIÇO, F. **Biologia Molecular**. 2002. Disponível em: <<http://azolla.fc.ul.pt/aulas/documents/MolecBiol2002.pdf>> Acesso em 22 set. 09.

CARVALHO, E.P. **Na contramão de Kyoto**. Folha de São Paulo, 09 abr. 2002. Opinião, Caderno A, p.43.

CHURIN, E.; DELMON, B. What can we do with pyrolysis oils? In: Ferrer, G.L., Maniatis, K., Buekens, A. Bridgwater, A.V. (Eds), **Pyrolysis and Gasification**. Elsevier Applied Science, London, 1989, p. 326-333.

CUNHA, R. **Tecnologia pode dobrar produção**. Disponível em: <http://comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=23&id=252&tipo=0>. Acesso: em 22 set. 09.

DA SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim do SBCTA**, Campinas, 1997, v.31, n.2, p.249-260.

Domínguez, J.M.O. **Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus**. Tesis de Doutorado. Universidad Complutense. Madrid, 2003.

FERRARI, R.A.; COLUSSI F, AYUB RA. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá- aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2004, v. 26, p. 101-102.



FOGARTY, W.M; KELLY, C.T. Amylases, amyloglicosidases and related gluconases. In: ROSE, A.H. **Economic microbiology – microbial enzymes and bioconversions**. London, Academic Press, 1980, vol.5.

FARABEE, M.J., 2002 - “On-line Biology Book”. Disponível em <http://gened.emc.maricopa.edu/bio/bio181/BIOBK/BioBookTOC.html> Acesso em: 22 set. 2009.

FRANCISCO, V.L.F. dos S.; BAPTISTELLA, C. da S.L. Cultura do abacate no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, 2005, v. 35, n. 5, p. 27-41.

FRANCO, C.M.L. et al. **Propriedades gerais do amido**. v.1. Série Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas. CEREDA, M.P. (Coord.) São Paulo: Fundação Cargill, 2001, 224p.

FUJII, M., HOMMA, T., TANIGUCHI, M. Synergism of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnol. Bioeng.**, 1988, v.32, p.910-15.

ICHIMARU, D. L. et al. Estudo dos fatores antinutricionais do caroço de abacate (*Persea americana*). **Coletânea do ITAL**, Campinas, 1982, v. 12, p. 67-83.

JAKUBASZKO, R. Biodiesel: faça você mesmo, e use. **DBO Agrotecnologia**. 2006, Ano 3 – n.8.

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 1996, v.47, p. 509-540.

KOLB, B.; ETTRE, L.S. Static Headspace-gas chromatography: theory and practice. **Wiley Inter-science**, USA, 2. ed., 2006, p. 53-160.

LADISCH, M. R.; LIN, K. W.; VOLOCH, M. AND TSAO, G. T. **Enzyme microb. Technol.** 1983, v. 5, p. 82.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. **Melhoria do Rendimento de Hidrólise Enzimática para Produção de Etanol a Partir de Farelo de Mandioca**. Brazilian Journal of Food Technology, 1999, v. 2, p. 111-118.

MARC, A.; ENGASSER, J.M. **Kinetics and Modelling of starch saccharification by glucoamylase**. IISHEB, 1987.

McKENNDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresources Technology**, 2002, v. 83, p. 37-46.

MONNA, M; YAMAMOTO, Y.; KAGEI, N.; KAINUMA, K. **Starch Stärke**. 1989, v.41, p.382-385.

OLIVEIRA, M.A. et al. Ceras para conservação pós-colheita de frutos de abacateiro cultivar Fuerte, armazenados em temperatura ambiente. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, 2000, v.57, p.777-780.

OLIVEIRA, M.C.S. **Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática**. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.

PARRO, J.E. **A visão do setor petróleo**. In: Perspectivas do álcool combustível no Brasil. São Paulo:IEE/USP, 1996, p. 166.

PASSARETTI, J. F. **Avaliação de hidrólises enzimáticas no caroço de abacate para produção de etanol**. Monografia – UNESP – FC, 41f. 2008.

PARAZZI, C. **Fatores Físicos e Químicos que Influenciam a Fermentação Alcoólica**. Centro de Ciências Agrárias – UFSCar. 2006.

PIMENTEL, I. C. **Enzimas amilolíticas e proteolíticas**. Piracicaba: Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, 1987. 52p.

REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1997.

REYES, J.; ZAMORA, P. P.; DURÁN, N.; Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, 1998, v. 21.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. E. **Enzyme microb.Technol.** 1989, v. 11, p. 626.

ROSSETTO, M.R.M.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2004, v. 24, p. 076-081.

ROSSELL, C.E.V. Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol. **Industrial Perspectives for Bioethanol**. Ed. Telma Franco. 2006, cap. 8, p.123-142.

SILVA, C. M. V.; **Isolamento e Caracterização do Amido da Semente de Abacate (Persea Americana Mill)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 1995.

TAFFARELLO, L. A. B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias**. Campinas. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2004.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, ab. 2004, v. 26, n. 1.

TORRES, L.M. **Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre**. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agranômicas da UNESP – Campos de Botucatu, 2009.

WALKER, G.J.; HOPE, P. M.. **Biochemical J.**, 1963, v. 86, p. 52.

ZANIN, G. M. et al. **Brazilian Bioethanol Program Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2000, v. 84-86, p. 1147-1161.