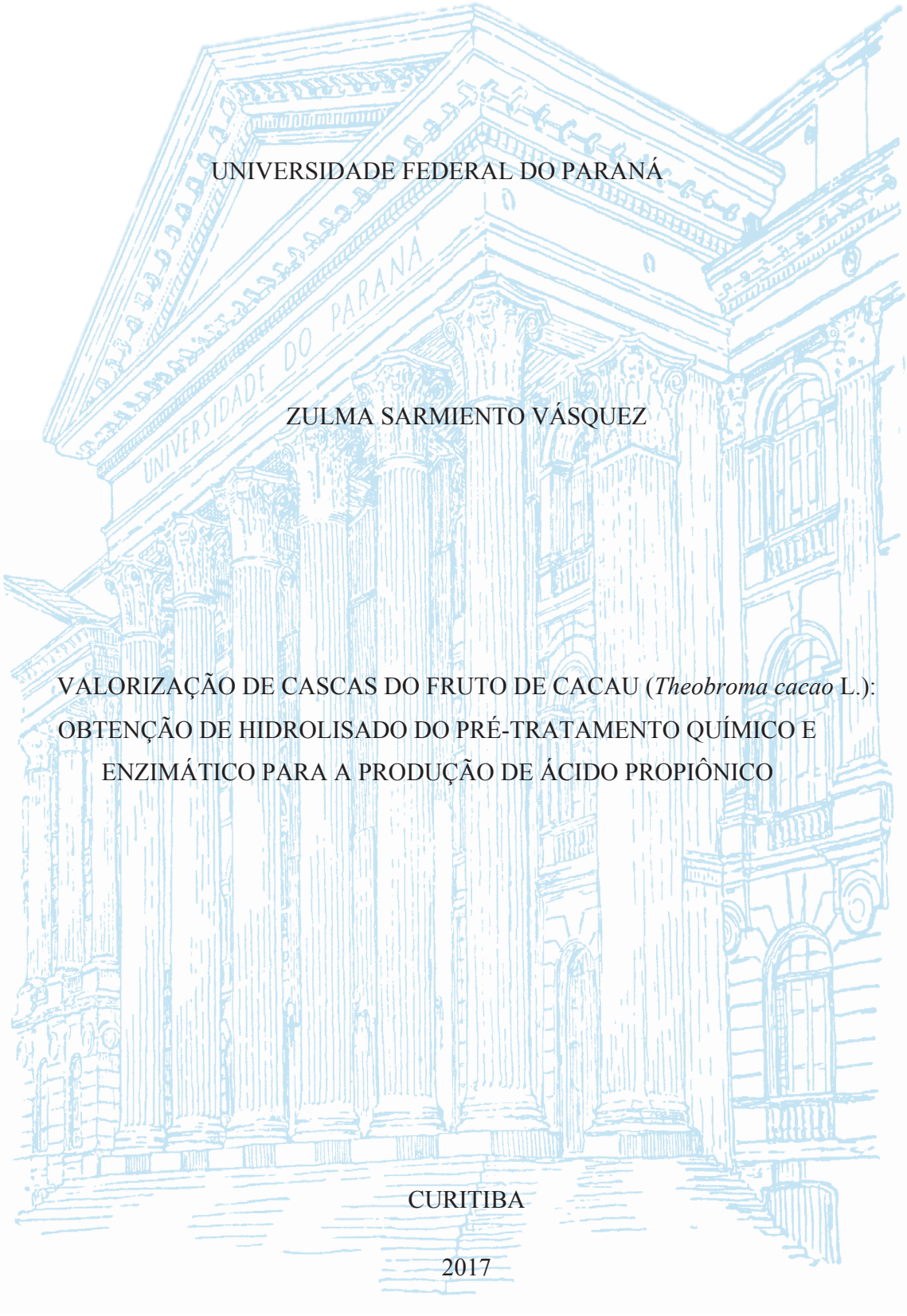


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ZULMA SARMIENTO VÁSQUEZ

VALORIZAÇÃO DE CASCAS DO FRUTO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.): OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO

CURITIBA

2017

ZULMA SARMIENTO VÁSQUEZ

VALORIZAÇÃO DE CASCAS DO FRUTO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.): OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Profª. Drª. Luciana P. S. Vandenberghe,

Co-orientadores:
Profª. Drª. Cristine Rodrigues
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2017

Catalogação na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

V335v Vásquez, Zulma Sarmiento
Valorização de cascas do fruto de cacau (*theobroma cacao l.*): obtenção de hidrolisado do pré-tratamento químico e enzimático para a produção de ácido propiônico / Zulma Sarmiento Vásquez – Curitiba, 2017.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017.

Orientadora: Luciana P. S. Vandenberghe
Coorientadores: Cristine Rodrigues; Carlos Ricardo Soccol

1. Cacau. 2. Àcido Propiônico. 3. Enzimas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vandenberghe, Luciana P. S. III. Rodrigues, Cristiane. IV. Soccol, Carlos
Ricardo. V. Título.

CDD: 624.024

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA
Programa de Pós Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
Código CAPES: 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ZULMA SARMIENTO VÁSQUEZ**, intitulada: "**VALORIZAÇÃO DE CASCAS DO FRUTO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.): OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 11 de Maio de 2017.

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CRISTINE RODRIGUES
Coorientador - Avaliador Externo (UFPR)

VALCINEIDE OLIVEIRA DE ANDRADE TANOBE
Avaliador Externo (UFPR)

A meus pais, Ricardo e Marina

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos Diretores, Coordenadores e Professores do Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de fazer parte do curso e por contribuir com a minha formação acadêmica e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Luciana Vandenberghe, por sua orientação, exemplo, ensinos, confiança e estímulos para o desenvolvimento deste estudo. E por ser um suporte importante durante esta etapa do meu desenvolvimento profissional.

À Professora Cristine Rodrigues, pela co-orientação, pelos conselhos e colaboração em todos os momentos.

À Professora Valcineide Tanobe, pela colaboração nas diversas análises e contribuições neste trabalho.

A meus pais Ricardo e Marina, pelo amor, confiança e apoio. Serão para sempre, o melhor exemplo de vida e uma das minhas maiores motivações. As minhas irmãs Lucia e Tatiana e ao meu sobrinho Sebastian, pelo amor e compreensão que nunca faltou, mesmo na distância.

A Luiz Eduardo, Josiane e avó Lizeth pelo amor, compreensão e apoio incondicional, por serem como minha família. À Judi e Romeu pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos na distância: Nidia, Manuela e Andrés, pelo carinho e amizade incondicional. A Deborah, Mitiyo, Suzan, Vanessa e Andressa pela amizade, suporte e fortaleza em todos os momentos.

Aos colegas do Programa pelas discussões valiosas, apoio no dia-dia e pelo intercâmbio de ideias. Em especial à Priscilla, Patrick, Dão, Nelson, Juliana, Ana Maria, Marcela, Omar, Emerson, Luis, Estefania, Lina, Kim, Grecia, Biaane e Oranys.

Aos professores Aristóteles Góes da UFES e ao Professor Hervé Rogez da UFPA, pela disponibilização da matéria prima utilizada para o desenvolvimento deste projeto.

Às Professoras Silvana Nisgoski e Érika Amano, pelas discussões no tema de anatomia vegetal.

A Mitiyo e ao Otacilío por facilitar e apoiar o desenvolvimento de todas as práticas no laboratório.

Ao laboratório Lacaut, ao Laboratório de Ótica e Instrumentação de raios X do Departamento de Física da UFPR, ao Laboratório de Biomassa (Biofix) da UFPR, ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e ao Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira, pelo apoio nas análises de caracterização realizadas para este trabalho. Em especial aos técnicos Eliane Lopes e Ériko Szameitat.

A todas as pessoas, que contribuíram para que este estudo se desenvolvesse adequadamente, o meu agradecimento.

RESUMO

A casca de cacau (CC) é considerada um resíduo problemático nas fases iniciais da indústria de processamento de cacau. As sementes são separadas do fruto e a casca é posteriormente descartada, originando possíveis focos de doenças fitossanitárias graves, se a disposição final não for feita adequadamente. Há algum tempo, as cascas têm sido utilizadas como ingrediente na alimentação animal e como fertilizante. No entanto, nos últimos anos este material despertou o interesse de pesquisadores de diferentes áreas devido ao seu importante conteúdo em pectina, sua capacidade antioxidante, potencial energético e suas características para produzir materiais adsorventes, ou carbono ativado. Assim, esta ampla gama de aplicações torna à CC um subproduto importante da cadeia produtiva do cacau.

Neste trabalho foi avaliada a possibilidade da produção de biomoléculas a partir da glucose obtida da hidrólise da CC. Em primeiro lugar, estabeleceram-se os pré-tratamentos alcalino (com NaOH 2,3% (m/v)) e enzimático, utilizando Cellic® CTec 2 (2,4% (v/v)) para obter glucose a partir da CC, atingindo concentrações máximas de 60,5 $g \cdot L^{-1}$ e obtendo-se um rendimento de 305 mg de glucose/g de CC. Em seguida, utilizando técnicas diferentes, realizou-se a caracterização física e química da CC *in natura* e pré-tratada com o propósito de avaliar a efetividade do tratamento. As alterações estruturais e morfológicas da CC foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Ao mesmo tempo, foram determinados os grupos funcionais das amostras, mediante a técnica de Infravermelho (FTIR). A difração de raios-X (DRX) permitiu determinar o índice de cristalinidade (CrI) antes e depois dos tratamentos. Finalmente, a estabilidade térmica e as propriedades do material lignocelulósico e suas temperaturas de degradação, foram determinadas por análise termogravimétrica (TG). O hidrolisado obtido da casca de cacau (HCC), foi caracterizado através da quantificação dos componentes por HPLC. Subsequentemente, foi proposto um meio de fermentação composto pelo HCC, como matéria-prima de baixo custo, adicionado glicerol e extrato de levedura, para obtenção de ácido propiônico (AP), utilizando a cepa de *Propionibacterium jensenii* DSM 20274 do banco de cepas do PPGEBB da UFPR. A concentração de AP no meio atingiu um máximo de 10,28 $g \cdot L^{-1}$ e uma produtividade de 0,079 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ após 72 h de processo. Assim, demostrou-se o potencial da CC para a obtenção de biomoléculas de interesse agroindustrial utilizando ferramentas biotecnológicas.

Palavras chave: casca de cacau, pré-tratamento básico, pré-tratamento enzimático, ácido propiônico.

ABSTRACT

Cocoa pod husks (CPH) have been considered a problematic waste in the initial stages of cocoa processing industry. CPHs are removed from cocoa fruit and are discarded, originating a possible outbreak of serious phytosanitary diseases if the disposal is not made properly. Initially, CPH was used as an ingredient in animal feed and as a fertilizer. Nonetheless, in the last years this material arouse the interest of researchers from different areas due to its important content in pectin, its antioxidant capacity, energy potential and its characteristics to produce adsorbent materials or activated carbon. Thus, this wide range of applications makes the CPH an important co-product of cocoa industry.

In this work, the viability of biotechnological production of biomolecules, using glucose deriving from cocoa pod husk hydrolysate (CPHH) was tested. Firstly, alkaline (with NaOH 2.3%) and enzymatic pre-treatment using Cellic® CTec 2 (2.4%), were established to obtain glucose from CPH reaching maximal concentrations of 60.5 $g \cdot L^{-1}$ and obtaining a yield of 305 mg glucose/g CPH. After that, using different techniques, physical and chemical characterization of raw and pre-treated CPH was completed to assess the effectiveness of treatment: structural and morphological changes of CPH were examined by Scanning Electronic Microscopy (SEM) verifying that the alkaline-enzymatic treatment promotes the removal of material such as lignin and hemicelluloses, since it is possible to observe the micro-fibrils of the cellulosic portion totally exposed. At the same time, the functional groups by Fourier Transform Infrared (FTIR) were determined. Wide-angle X-ray scattering patterns of CPH were obtained in the reflection mode, enabling the determination of the crystallinity index (CrI) before and after treatments. Finally, the thermal stability and properties of the lignocellulosic material and its degradation temperatures were analyzed by thermo-gravimetric analysis (TG). The hydrolysate was characterized through quantification of its components by HPLC. Subsequently, a basal medium composed by CPHH, as low-cost feedstock, added off glycerol and yeast extract, is proposed to obtain propionic acid using *Propionibacterium jensenii* DSM 20274 from strains collection of PPGEBB-UFPR. AP concentration in the proposed medium, reached a maximum of 10.28 $g \cdot L^{-1}$ and a yield of 0.079 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ after 72 h of process. Thus, the potential of CPH to obtain biomolecules of agroindustrial interest, was demonstrated through biotechnological tools.

Key-words: Cocoa pod husk, basic pretreatment, enzymatic pretreatment, propionic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Pesquisa relacionada com a produção biotecnológica de ácido propiônico.	16
Figura 2.	*Theobroma cacau* L.	19
Figura 3.	Cadeia de valor do cacau	20
Figura 4.	Produção mundial de amêndoas de cacau 2014/2015	20
Figura 5.	Histórico de produção de cacau no Brasil. Produção *vs*. Rendimento	21
Figura 6.	Exportações dos produtos de cacau e principais países exportadores em 2015.	22
Figura 7.	O fruto do cacau e resíduos	23
Figura 8.	Pré-tratamentos para a sacarificação do material lignocelulósico.	26
Figura 9.	Comércio internacional do AP, suas sais e seus ésteres.	31
Figura 10.	Visão geral do metabolismo de *Propionibacterium acidipropionici*	34
Figura 11.	Aplicação do AP na agricultura e na fabricação de ração animal	36
Figura 12.	Etapas de acondicionamento da casca do cacau	38
Figura 13.	Fragmento de casca de cacau	45
Figura 14.	Meios utilizados no processo de seleção do microrganismo	50
Figura 15.	Fluxograma de processo para a produção de AP a partir de hidrolisado da casca pré-tratada química e enzimáticamente	59
Figura 16.	Superfície de resposta do DCCR para determinação dos parâmetros de processo para o pré-tratamento alcalino da casca de cacau	61
Figura 17.	Diagrama de Pareto do DCCR para determinação dos parâmetros de processo para o pré-tratamento alcalino da casca de cacau	61
Figura 18.	Balanço de massa para o tratamento básico-enzimático	64
Figura 19.	Identificação mediante microscopia ótica das estruturas presentes na casca do cacau.	65
Figura 20.	Micrografia Eletrônica Varredura (MEV) das amostras de casca de cacau	67
Figura 21.	Difratogramas DRX de amostras de casca de cacau.	69
Figura 22.	Espectros de FTIR das amostras de casca de cacau	71
Figura 23.	Curva termogravimétrica das amostras de casca de cacau sem e com pré-tratamento básico	73
Figura 24.	Coloração de Gram para *Propionibacterium jensenii* DSM 20274 (C_7)	80
Figura 25.	Diagrama de Pareto – Influência de componentes adicionados ao meio para a produção de AP	82
Figura 26.	DCCR – Estudo da influência das concentrações das fontes de C e N.	84
Figura 27.	Cinética de fermentação para a produção de AP, realizada por *P. jensenii* em meio contendo hidrolisado de casca de cacau e glicerol como fontes de carbono realizada em frascos do tipo *Schott* de 100 mL.	89
Figura 28.	Cinética de crescimento de *P. jensenii* em meio contendo hidrolisado de casca de cacau e glicerol como fontes de carbono realizada em frascos do tipo Schott de vidro de 100 mL.	90
Figura 29.	Produção de AP em biorreator de bancada de 2 L	91
Figura 30.	Cinética de fermentação para a produção de AP, realizada por *P. jensenii* em meio contendo hidrolisado de casca de cacau e glicerol como fontes de carbono realizada em biorreator de 2 L.	91
Figura 31.	Cinética de fermentação: consumo de fontes de carbono vs. biomassa de *P. jensenii* em meio contendo glucose do hidrolisado de casca de cacau e glicerol como fontes de carbono realizada em biorreator de 2 L.	92
Figura 32.	Placa de Petri para avaliação das propriedades antimicrobianas do meio de fermentação utilizado por *P. jensenii* DSM 20274	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Estudos de pré-tratamentos alcalinos de material lignocelulósico	27
Quadro 2.	Propriedades físico- químicas do AP	30
Quadro 3.	Estudos sobre a produção de AP mediante diferentes sistemas de fermentação e uso de diferentes fontes de carbono	35
Quadro 4.	Microrganismos do gênero *Propionibacterium* do banco de cepas do PPGEBB utilizados para a produção de AP	51
Quadro 5.	Temperaturas de degradação da análise termogravimétrica	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Referências de caracterização físico química da casca de cacau	24
Tabela 2.	DCCR - Condições de otimização para o pré-tratamento alcalino da casca de cacau	48
Tabela 3.	Meio de fermentação para *Propionibacterium*	52
Tabela 4.	Planejamento experimental *Plackett & Burman* para determinação da influência de componentes do meio sobre a produção de AP	53
Tabela 5.	Níveis estudados de glucose e glicerol para a otimização da produção de AP	54
Tabela 6.	Variação da relação das fontes de carbono	55
Tabela 7.	Concentrações das substâncias a analisar para a determinação de atividade antimicrobiana do caldo de fermentação	58
Tabela 8.	Resultados DCCR: Determinação das condições de pré-tratamento alcalino	60
Tabela 9.	Quantificação de íons solúveis para diferentes amostras de casca de cacau	62
Tabela 10.	Quantificação de açúcares solúveis para diferentes amostras de casca de cacau	62
Tabela 11.	Parâmetros físico-químicos obtidos para a casca de cacau sem tratamento	75
Tabela 12.	Resultados de quantificação de lignina e carboidratos estruturais presentes no material analisado	76
Tabela 13.	*Screening* das cepas de Propionibacterium para produção de AP	79
Tabela 14.	Delineamento experimental e resultados - Influência de componentes adicionados ao meio para a produção de AP	81
Tabela 15.	Resultados DCCR para a otimização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio	83
Tabela 16.	Resultados da variação na concentração das fontes de carbono	85
Tabela 17.	Produção de AP utilizando uma relação de fontes de carbono de 1:3	87
Tabela 18.	Comparação da influência da agitação sobre produção de AP em meio sintético e tubos de 21 mL	88
Tabela 19.	Comparação da influência da escala na produção de AP com meio com hidrolisado de casca de cacau e 50 rpm	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **15**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **19**

2.1. ***Theobroma cacau* L.*: produtos e resíduos*** **19**

2.1.1. *Descrição da planta* **19**

2.1.2. *Produção e mercado mundial de cacau* **19**

2.1.3. *Comércio internacional de produtos de cacau* **21**

2.1.4. *Geração de resíduos* **22**

2.1.5. *Tipos de pré-tratamento para material lignocelulósico* **25**

2.2. Glicerol **27**

2.3. Ácidos orgânicos **29**

2.3.1. *Ácido propiônico (AP)* **30**

2.3.1.1. Contexto histórico **30**

2.3.1.2. Produção e mercado **31**

2.3.1.3. Biossíntese do ácido propiônico **32**

2.3.1.4. Microrganismos usados para a produção de AP **33**

2.3.1.4.1. Metabolismo de produção e requerimentos nutricionais **33**

2.3.1.5. Aplicações industriais **35**

3. MATERIAL E MÉTODOS **37**

3.1. *Levantamento de informação – Revisão bibliográfica* **37**

3.2. *Recebimento e acondicionamento da casca de cacau* **38**

3.3. *Caracterização físico-química da casca de cacau* **38**

3.3.1. *Determinação de umidade, pH, atividade de água (a_w), cinzas, açúcares, íons e proteínas* **39**

§ *Sólidos totais e umidade* **39**

§ *Determinação de pH* **40**

§ *Determinação da atividade de água (a_w)* **40**

§ *Determinação do teor de cinzas* **40**

§ *Determinação do teor de açúcares redutores* **41**

§ *Determinação de Íons* **41**

§ *Determinação de proteínas* **41**

3.3.2. *Determinação de extraíveis em água, etanol e éter de petróleo* **42**

3.3.3. *Determinação de carboidratos estruturais e lignina* **43**
3.3.4. *Análise histológica da casca de cacau* **45**
3.3.5. *Determinação da morfologia por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)* **46**
3.3.6. *Determinação do índice de cristalinidade por difração de raios X* **46**
3.3.7. *Determinação das propriedades térmicas mediante análises termogravimétricas (TG/dTg)* **47**
3.3.8. *Determinação de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho (FTIR)* **47**
3.4. *Determinação das condições de processo para o pré -tratamento químico e enzimático da casca de cacau* **47**
3.4.1. *Planejamento experimental DCCR: condições para o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) da casca de cacau* **48**
3.4.2. *Determinação das condições de processo para o tratamento da casca de cacau com a enzima Cellic® CTec 2.* **49**
3.5. *Seleção do microrganismo para produção de ácido propiônico* **50**
3.5.1. *Meio de reativação e conservação* **50**
3.5.2. *Meio para produção do inóculo* **51**
3.5.3. *Meio sintético de fermentação* **51**
3.6. *Produção de ácido propiônico* **52**
3.6.1. *Produção de ácido propiônico com o hidrolisado obtido a partir da casca de cacau* **52**
3.6.1.1. Planejamento experimental Plackett & Burman: sais necessários ao meio **53**
3.6.1.2. Planejamento experimental DCCR: otimização das fontes de carbono e nitrogênio (C/N) **53**
3.6.1.3. Efeito da concentração das fontes de carbono, mantendo a relação C/N **55**
3.6.1.4. Determinação da melhor condição de incubação: estática ou agitada **55**
3.6.1.5. Quantificação de biomassa **55**
3.6.1.6. Fermentação em frasco do tipo Schott de 100 mL **56**
3.6.1.7. Fermentação em biorreator agitado **57**
3.7. *Quantificação de compostos* **57**
3.8. *Teste de aplicação: determinação da atividade antimicrobiana do meio fermentado* **57**
3.9. *Análise estatística* **58**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **60**
4.1. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO APÓS PRÉ-TRATAMENTO BÁSICO-ENZIMÁTICO E DA CASCA DO CACAU **60**
4.1.1. *Pré-tratamento químico-enzimático de cascas de cacau* **60**
4.1.2. *Caracterização do hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento da casca de cacau* **62**

4.1.3. *Caracterização físico-química da casca de cacau pré-tratada química e enzimáticamente.* **64**

4.1.3.1. Análise histológica da casca de cacau **64**

4.1.3.2. Determinação da morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV **67**

4.1.3.3. Determinação do grau de cristalinidade por difração de raios X **68**

4.1.3.4. Determinação de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho (FTIR) **70**

4.1.3.5. Determinação das propriedades térmicas mediante análises termogravimétricas (TG/dTg) **72**

4.1.3.6. Determinação de parâmetros físico-químicos **75**

4.1.3.7. Determinação de carboidratos estruturais e lignina **76**

4.2. CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO A PARTIR DO HIDROLISADO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO DA CASCA DE CACAU **79**

4.2.1. *Escolha do microrganismo para produção de ácido propiônico* **79**

4.2.2. *Otimização da produção de ácido propiônico em meio com hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento básico enzimático da casca de cacau* **80**

4.2.2.1. Planejamento experimental Plackett & Burman (P&B): sais necessários ao meio **81**

4.2.2.2. Planejamento experimental DCCR: otimização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio (relação C/N) **82**

4.2.2.3. Efeito da concentração das fontes de carbono **85**

4.2.2.4. Determinação da melhor condição de incubação: estática ou agitada **87**

4.2.2.5. Fermentação em frasco do tipo Schott *de vidro de 100 mL* **88**

4.2.2.6. Fermentação em biorreator agitado de 2 L **91**

4.2.3. *Teste de aplicação: determinação da atividade antimicrobiana do meio fermentado* **94**

5. CONCLUSÕES **95**

6. PERSPECTIVAS **96**

7. REFERÊNCIAS **97**

8. APÊNDICES **103**

1. INTRODUÇÃO

A busca de sistemas alternativos de produção eficiente e sustentável de todo tipo de produtos, obedece principalmente o surgimento de duas problemáticas de ordem mundial de grande incidência: o crescimento populacional e a deterioração do meio ambiente (com a consequente limitação da disponibilidade de recursos naturais). Com um crescimento populacional de 58% em meio século, passando de 3.065 milhões de pessoas em 1960 a 7.347 milhões em 2015 (Banco Mundial, 2017), é necessário a otimização de processos industriais com o propósito de conseguir uma produção equitativa, limpa e eficiente de alimentos. Estes processos de produção, tanto dos alimentos, quanto dos insumos empregados, devem utilizar apropriadamente os recursos naturais sem afetar o meio ambiente, reduzindo a geração de resíduos e dispondo dos gerados adequadamente. Neste tipo de desafio, o compromisso e investimento da empresa pública e privada, a intervenção das comunidades, a geração de políticas eficazes, a geração de novos conhecimentos mediante a pesquisa e a criação, adaptação e implementação de tecnologias eficientes, serão importantes para disponibilizar alternativas de produção que permitam suprir as necessidades de cada vez mais pessoas no planeta Terra mantendo o equilíbrio com a natureza.

Com uma maior demanda por alimentos de todo tipo, as indústrias que fornecem insumos para seu processamento ou fabricação, experimentam em consequência, a mesma dinâmica de crescimento. Como exemplo, levando em conta que uma das principais fontes de proteína (existe proteína de origem animal e vegetal) na alimentação humana é a carne de origem bovina (22 g de proteína para 100 g de carne, segundo Latham (2002), indústrias dedicadas à fabricação de substâncias para a conservação de ensilagem e produtos concentrados (que por sua vez são fonte de alimento para o gado) são cada vez mais solicitadas no mercado.

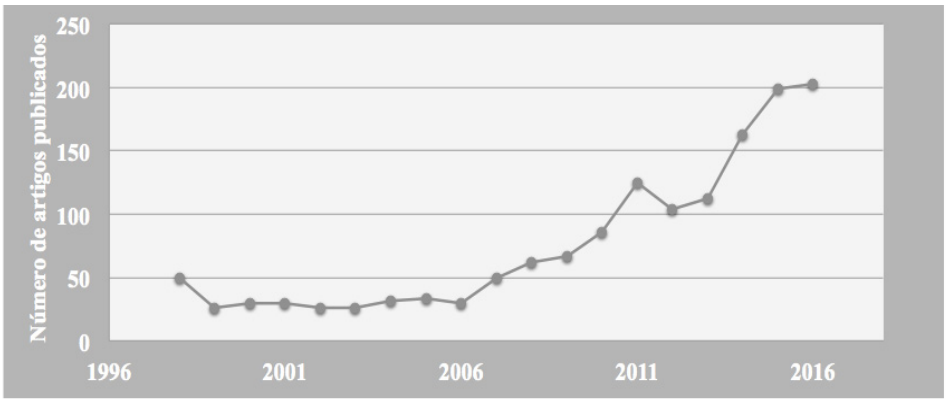
Dentre os compostos usados como conservantes, os ácidos orgânicos representam grande porção da demanda atual. Os ácidos mais utilizados neste segmento são o fórmico, o butírico, o acético, o sórbico, o benzóico e o propiônico (BASF, 2013). O ácido propiônico (AP), objeto desde estudo, tem mostrado um crescimento das exportações de 71% em valor (dólares) e de 63% em quantidade (toneladas), no período de 2001 – 2015 (ITC, 2017).

Alguns ácidos orgânicos são produzidos exclusivamente por síntese química usando como matéria prima o petróleo, gerando certa preocupação pela incerteza sobre a disponibilidade futura deste recurso não renovável. Sendo assim, a procura de novas rotas de produção baseando-se em matérias primas alternativas e com implicações ambientais de menor relevância, têm sido intensificada ao longo dos últimos anos. Embora os processos de síntese química sejam criticados por ocasionar poluição ambiental, no caso da produção de AP e outros compostos para os quais estão sendo desenvolvidas as técnicas de produção biotecnológica, por enquanto, a rota original,

continua sendo a melhor alternativa. No estudo de Tufvesson *et al*., (2013), efetuado por simulação de computador, no qual foi realizada uma Avaliação de Ciclo de Vida (ACV) sobre a produção de AP a partir de matérias primas renováveis e através de processos de produção por via fermentativa em grande escala, são apresentados resultados conclusivos. Assumindo concentrações de pelo menos 50 $g \cdot L^{-1}$ ao final da fermentação, a produção biológica de AP por um lado, geraria custos de produção estimados em 2,5 $€ \cdot Kg^{-1}$ enquanto que o custo de produção mediante síntese química está entre 1-2 $€ \cdot Kg^{-1}$. Tal fato é um desincentivo aos investimentos necessários para dar início a este método de produção. Por outro lado, e tendo hipóteses estabelecidas para dito estudo, a produção biológica do AP, daria origem a emissões de gases efeito estufa (expressos em equivalentes de CO_2) 50% a mais do que as produzidas na rota de síntese química a partir de combustíveis fósseis, isto devido principalmente ao alto consumo de energia e água durante o processo de *downstream*. Apesar do processo de fermentação para produção de AP ter sido descrito desde 1923 (Boyaval, 1995), ainda são necessários mais estudos que permitam implementar a produção de maneira sustentável e economicamente viável.

Para ilustrar melhor a relevância deste tema, uma revisão bibliográfica foi conduzida na base de dados de revistas científicas indexadas no *Science Direct* (https://www.sciencedirect.com/), usando a seguinte combinação de palavras chave no campo "*all fields*": "*fermentation*", "*propionic acid*", "*production*" e "*biotechnology*". A busca resultou em 2005 artigos; destes, 440 artigos foram publicados antes de 1997, e os restantes 1.565 no período de 1998 até 2017 (primeiros três meses). Como é apresentado na Figura 1, durante os últimos 10 anos os artigos publicados sobre o tópico, ocorreu um crescimento de 85%, passando de 30 artigos em 2006 para 203 em 2016; e durante os primeiros três meses de 2017, já foram publicados 112 artigos relacionados com este tema. Espera-se que em um futuro próximo o conhecimento construído em torno do processo de produção, possa ser implementado industrialmente para benefício das múltiplas áreas produtivas e econômicas que estão relacionadas com este composto.

FIGURA 1. PESQUISA RELACIONADA COM A PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE AP



FONTE: dados *Science Direct*. Ilustração: A autora (2017)

De acordo com publicações mais recentes, os principais desafios para pesquisas futuras estão relacionados com i) aumento da produtividade e dos rendimentos, através da implementação de sistemas de fermentação que favoreçam o processo; ii) uso de matérias-primas com importante conteúdo de fontes de carbono, fontes de nitrogênio e micronutrientes para promover o metabolismo dos microrganismos utilizados no processo e iii) melhoramento genético dos microrganismos que venham a apresentar características desejáveis para a produção do AP.

Dentre as matérias primas alternativas para o desenvolvimento de processos de produção, encontram-se aquelas de natureza lignocelulósica. Estes materiais são considerados resíduos sem valor, provenientes de outros processos de produção agroindustrial, que na maioria dos casos gera problemas fitossanitários e de salubridade dentro das plantações ou são inconvenientes devido ao volume que podem chegar a ocupar e aos possíveis custos de descarte. O uso de material lignocelulósico (cana-de-açúcar, palma, farelo de soja, etc.) em processos biotecnológicos têm sido explorado há várias décadas e tem mostrado resultados relevantes para diferentes indústrias. Utilizando o material lignocelulósico como matéria prima é possível, por um lado reduzir os custos de produção, e por outro, dar continuidade à implementação do conceito de biorefinarias, que cada vez está tomando mais força no âmbito industrial e agroindustrial.

Um material lignocelulósico pouco explorado e significativamente problemático dentro das plantações, é a casca do fruto do cacau (*Theobroma cacao* L.). Neste fruto, a semente corresponde só a 15-20% da biomassa total do fruto, deixando 75-80% (Prabhakaran, 2010) de material considerado até pouco tempo, como resíduo. O principal produto do cultivo do cacau, o chocolate, provém da fermentação das sementes. Em 2016, as exportações de chocolate atingiram um valor $25.700 milhões de dólares equivalentes a mais de 5,4 milhões de toneladas do produto (ITC, 2017). Em países como Suíça, o consumo *per capita* chegou a ser de 8,8 Kg em 2016, enquanto que na América Latina, durante o mesmo período, Chile ocupou o primeiro lugar em consumo *per capita* com um total de 2,1 Kg (Worldatlas, 2017).

Neste estudo "Valorização de cascas do fruto de cacau (*Theobroma cacao* L.): obtenção de hidrolisado do pré-tratamento químico e enzimático para a produção de ácido propiônico" faz parte do projeto Rede Integrada de Programas de Pós-graduação em Biotecnologia para o Desenvolvimento Científico, Tecnológico, de Inovação e Formação de Recursos na Cadeia Produtiva do Cacau – BIOCAU com apoio financeiro da CAPES-PROCAD 2013, e do subprojeto 2 intitulado "Aproveitamento da casca de cacau".

Neste estudo, e de maneira inédita, pretende-se explorar o aproveitamento dos compostos da casca do fruto do cacau para a produção de biomoléculas de interesse agroindustrial, por meio da aplicação de técnicas biotecnológicas. A obtenção do AP foi desenvolvida usando o microrganismo

Propionibacterium jensenii (DSM 20274) para a fermentação com o uso de um meio de produção cujo principal componente é o hidrolisado produzido mediante a hidrólise química e enzimática da casca do cacau, o glicerol e o extrato de levedura.

O objetivo deste trabalho é valorizar as cascas de cacau por meio do pré-tratamento químico e enzimático e produzir AP, considerado como uma biomolécula de médio a alto valor agregado. Para alcançar este alvo, foram propostos os seguintes objetivos específicos: Caracterizar físico-químicamente a casca do fruto de cacau procedente do estado do Pará; Determinar as melhores condições de hidrólise química e enzimática das cascas de cacau; Analisar o material pré-tratado e *in natura* (MEV, FTIR, DRX, TG e outras técnicas); Selecionar cepas produtoras de AP disponíveis no banco de cepas do PPGEBB da UFPR; Estudar a produção de AP a partir de hidrolisado químico e enzimático de cascas de cacau.

Finalmente, com este trabalho aspira-se contribuir com os conhecimentos relacionados às alternativas de produção e avanços no uso de um dos resíduos agroindustriais de relevância no Brasil, a casca do cacau, para a geração de biomoléculas de grande importância econômica e industrial ao nível mundial.

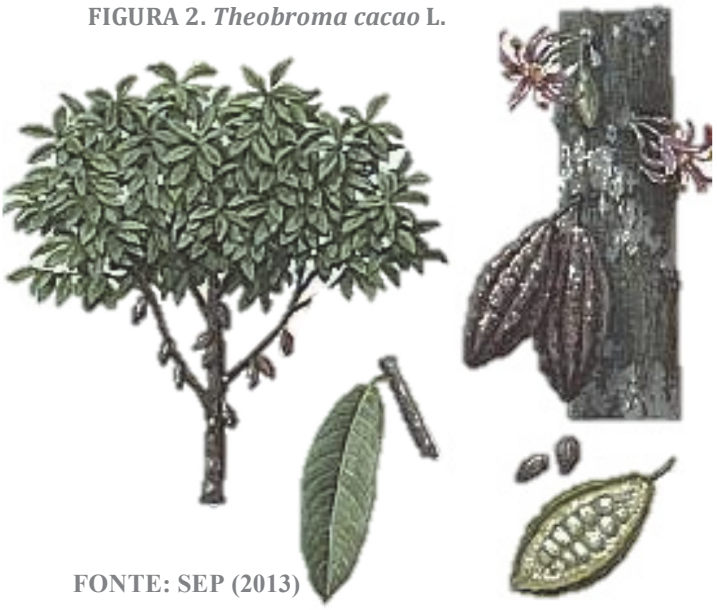
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Theobroma cacau* L.*: produtos e resíduos*

2.1.1. *Descrição da planta*

Theobroma cacao L. (Figura 2) é uma árvore perene que atinge alturas entre 8 e 15 m e cujo *habitat* natural está localizado na bacia amazônica e outras áreas tropicais de América Central e do Sul. Também é cultivado em áreas tropicais do continente africano. Atinge a fase adulta aos 10 anos, podendo chegar a 50 anos de idade. É uma árvore sensível a variações climáticas e adaptada a solos profundos e férteis, com incidência de chuvas regulares (Ceplac, 2012). O fruto desta árvore é o cacau. Existem três variedades deste fruto: *Forastero*, que fornece aproximadamente 95% da demanda mundial de cacau; *Criollo* que é uma variedade originalmente cultivada no Norte, Centro e Sul da América e, finalmente a variedade *Trinitário* que é produto da hibridização das variedades anteriores e junto com a produção da variedade *Criollo*, representando o 5% restante da produção mundial de amêndoas. Dependendo da variedade, os frutos apresentam uma pigmentação característica. Por exemplo, os frutos da variedade *Criollo* apresentam variação de cor entre vermelhos escuro e cor vinho, os da variedade *Forasteiro* normalmente são verdes ou amarelos e os da variedade *Trinitário*, apresentam qualquer uma destas cores, antes mencionadas (Lima *et al*, 2011).

FIGURA 2. *Theobroma cacao* L.



FONTE: SEP (2013)

2.1.2. *Produção e mercado mundial de cacau*

O fruto de cacau tem relevância devido ao uso comercial que é atribuído às sementes, principalmente na indústria de alimentos. Após diferentes etapas de processamento como é apresentado na Figura 3, são obtidos a manteiga e pasta de cacau, o cacau em pó e o chocolate. O

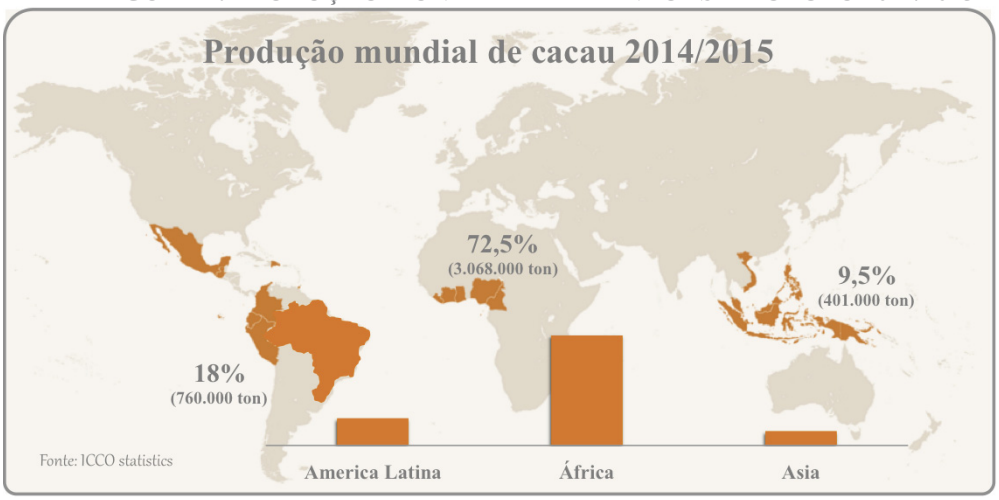
cultivo do cacau também é importante para muitas das regiões produtoras em diferentes países, devido a que a lavoura cacaueira encontra-se baseada em sistemas de agricultura familiar, sustentabilidade e práticas agrícolas com baixas emissões de gases de efeito estufa (Sebrae, 2014).

FIGURA 3. CADEIA DE VALOR DO CACAU

FONTE: A autora (2017)

Segundo os dados publicados pela Organização Internacional do Cacau (ICCO), na safra 2014/2015 a produção de sementes de cacau foi estimada em 4 milhões de toneladas, sendo África o maior produtor mundial com 73% da participação da produção, seguido pela América com 18% da participação e, finalmente, Ásia e Oceania com um percentual estimado em 9% (Figura 4). Na América, os principais produtores são Equador e Brasil.

FIGURA 4. PRODUÇÃO MUNDIAL DE AMÊNDOAS DE CACAU 2014/2015

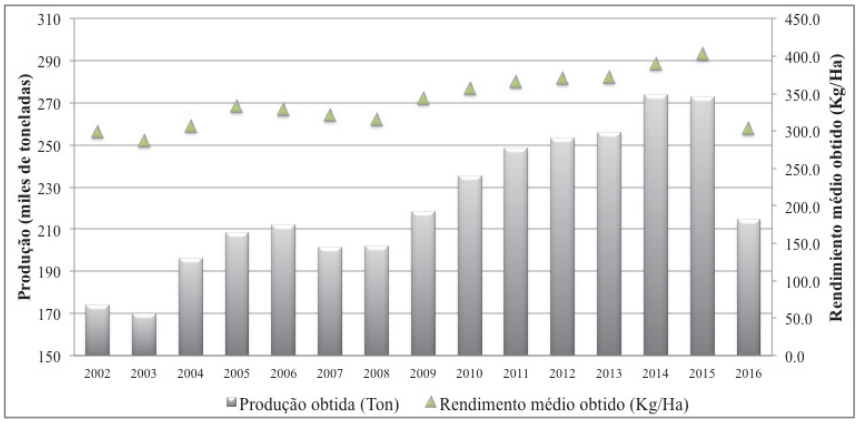


FONTE: dados ICCO. Ilustração: A autora (2017)

Nos anos 70 o Brasil era o segundo maior produtor mundial de cacau, com uma produção de cerca de 350 mil toneladas/ano. Os produtores de cacau foram gravemente atingidos pelas perdas ocasionadas com a doença causada pelo fungo conhecido popularmente como vassoura da bruxa (*Moniliophtora perniciosa)*, e a produção do país diminuiu consideravelmente, passando a ser importador da amêndoa. Atualmente, e graças aos estudos e pesquisas desenvolvidos sobre o controle fitossanitário do fungo, à assessoria técnica para o manejo adequado da lavoura, bem como à expansão do cacau na Amazônia, o Brasil tem se recuperado (Sebrae, 2014).

Segundo os dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), em 2016 a produção nacional atingiu um total de 215 mil toneladas de amêndoas de cacau, com rendimento de 304 $Kg \cdot ha^{-1}$. Entretanto, em 2015 a produção tinha sido calculada em 273 mil toneladas com um rendimento de 403 $Kg \cdot ha^{-1}$, apresentando para a última safra uma diminuição de 33% em rendimento (Figura 5). Esta importante queda, está relacionada ao comportamento das principais variáveis climáticas que afetam a lavoura cacaueira nas principais zonas de produção do país (Bahia e Pará), nas quais os níveis de pluviosidade, temperaturas e umidade apresentaram uma influência importante sobre os rendimentos do cultivo do cacau, segundo os diferentes relatórios publicados em 2016 e 2017 pela Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira).

FIGURA 5. HISTÓRICO DA CULTURA DE CACAU NO BRASIL: PRODUÇÃO *VS.* RENDIMENTO



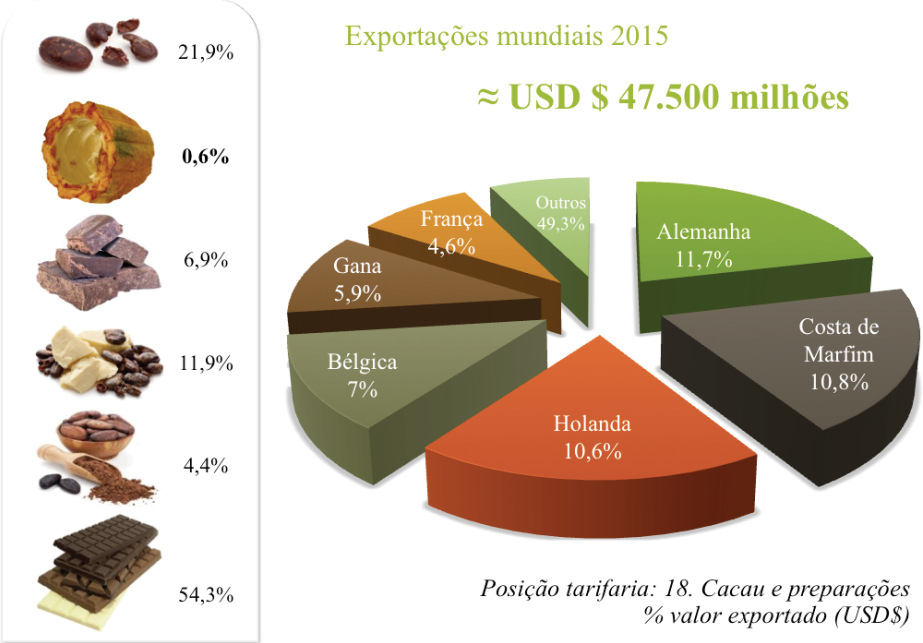
FONTE: dados IBGE. Ilustração: A autora (2017)

2.1.3. *Comércio internacional de produtos de cacau*

Estimativas do Centro de Comércio Internacional (ITC), para o ano de 2015 relatam que $47,5 milhões de dólares foram contabilizados para as exportações mundiais dos produtos das sementes do cacau, e classificados nas seguintes posições tarifárias: sementes, cascas, pasta de

cacau, manteiga, cacau em pó e chocolate. O chocolate é o principal produto comercializado, com 54,3% da participação em valor exportado em nível mundial (Figura 6). De forma geral, os principais exportadores mundiais dos derivados da semente do cacau são Alemanha com 12% e Costa do Marfim e Holanda com 11% cada um.

FIGURA 6. EXPORTAÇÕES DOS PRODUTOS DE CACAU E PRINCIPAIS PAÍSES EXPORTADORES EM 2015



FONTE: dados ITC. Ilustração: A autora (2017)

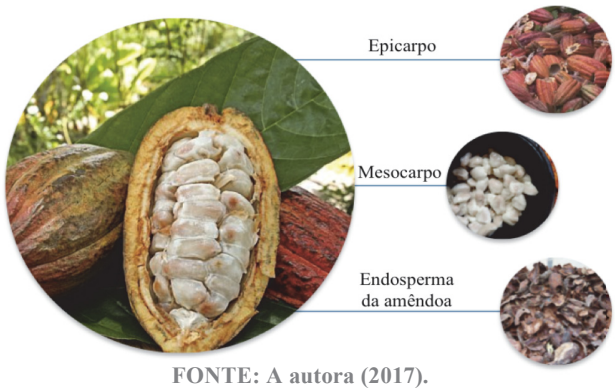
2.1.4. *Geração de resíduos*

Uma vez que a amêndoa do cacau é extraída para iniciar o processo de fermentação, o material que a acompanha (Figura 7): casca externa do fruto (epicarpo), a casca que cobre a amêndoa (endosperma) e a mucilagem externa da mesma (mesocarpo), são descartados e considerados na maioria dos casos como resíduo com pouco ou nenhum valor comercial.

Do fruto do cacau e segundo o reportado por Prabhakaran Nair, (2010), entre 70% e 75% da massa seca do fruto corresponde à casca externa ou epicarpo. Conforme o mesmo autor relata, os frutos de cacau têm forma ovalada, com tamanhos que variam segundo a variedade, e que podem estar entre 15-30 cm de comprimento, entre 8–10 cm de largura e a espessura da casca do fruto entre 0,1 e 0,15 cm. As cores também dependem da variedade, e se observam colorações verde

durante o crescimento e no processo de amadurecimento os frutos mostram cores amarelo, vermelho ou cor de vinho.

FIGURA 7. FRUTO DO CACAU E RESÍDUOS



FONTE: A autora (2017).

Atualmente, as cascas de cacau representam para algumas plantações, um problema fitossanitário dadas as grandes quantidades produzidas e a falta de mecanismos de disposição do resíduo, que até agora são implementados em algumas fazendas como material de queima para combustível ou como material de compostagem. Tais processos não representam esforços e custo dentro da área de produção; ou em outros casos, como por exemplo acontece em Gana, a casca torna-se matéria prima na fabricação de ração animal (Afoakawa, 2010).

Surpreendentemente, a casca do fruto do cacau, é um produto que atualmente está sendo comercializado mundialmente por mais de 40 países. Em 2015, o ITC reportou que foram exportadas 214 mil toneladas de casca de cacau, sendo os principais exportadores Costa de Marfim, Holanda e Alemanha com participações de 45%, 18% e 14% respectivamente, agrupando mais de 76% da participação do mercado mundial para este produto. Da mesma forma, os principais importadores neste período foram Holanda com 18% da participação e França e Bélgica com participação de 14% cada um, agrupando assim quase 50% do total mundial importado em quantidade. O valor atingido para as exportações de casca de cacau em 2015 foram de $277 milhões de dólares. Os dados, tanto de produção quanto de comércio internacional, permitem projetar que devido à grande disponibilidade da casca do fruto de cacau, é possível e necessário um aproveitamento eficiente e comercialmente atrativo deste resíduo agroindustrial. Diante deste cenário, o presente projeto visa aproveitar os compostos constitutivos da casca do cacau para a produção de biomoléculas mediante a implementação de técnicas e ferramentas biotecnológicas. É importante ressaltar que até a presente data, não foram encontradas referências que utilizassem este material para tal propósito. Atualmente existem poucos estudos sobre as características físico-químicas da casca de cacau. Os trabalhos que proporcionam resultados a este respeito, apresentam-se na Tabela 1.

TABELA 1. REFERÊNCIAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA CASCA DE CACAU

Componente	Valores	Referências
Proteína	4,21 ± 0,16*	Martínez *et al.,* 2012
	8,6 ± 0,09*	Vriesmann *et al.*, 2011
	10,74*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
Cinzas	6,7 ± 0,02*	Vriesmann *et al.*, 2011
	8,42 ± 0,10*	Martínez *et al.,* 2012
	9,1*	Mansur *et al.*, 2014
	10,02*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
	13,5***	Syamsiro, *et al*. 2012
Gorduras	2,34 ± 0,08*	Martínez *et al.,* 2012
Carboidratos	29,04 ± 0,18*	Martínez *et al.,* 2012
	32,3 ± 1,8*	Vriesmann *et al.*, 2011
Umidade	6,53 ± 0,13**	Martínez *et al.,* 2012
	8,5 ± 0,06**	Vriesmann, *et al*, 2011
	10,5***	Ofori-Boateng e Lee, 2013
	16,1***	Syamsiro, *et al*. 2012
Celulose	35,0*	Mansur *et al.*, 2014
	24,24*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
Hemicelulose	8,72*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
	11,0*	Mansur *et al.*, 2014
Lignina	14,6*	Mansur *et al.*, 2014
	21,4 ± 0,6*	Vriesmann *et al.*, 2011
	26,38*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
Pectina	6,1*	Mansur *et al.*, 2014
Lipídeos	1,5 ± 0,13*	Vriesmann *et al.*, 2011
Açúcares redutores	10,4 ± 0,7*	Vriesmann *et al.*, 2011
Fibra dietética total	36,6 ± 0,01*	Vriesmann *et al.*, 2011
Teobromina	0,34*	Ofori-Boateng e Lee, 2013
Minerais	**(mg/100 g d.m.)**	
Ca	254,0 ± 11,31	Vriesmann *et al.*, 2011
Fe	5,8 ± 0,11	
K	2768,0±51,97	
Mg	110,9 ± 0,01	
Na	10,5 ± 0,60	
Minerais	**(mg·Kg^{-1} d.m.)**	
Cu	6,18 ± 0,02	Vriesmann *et al.*, 2011
Mn	35,72 ± 0,03	
Se	0,01 ± 0,006	
Zn	39,74 ± 0,06	

d.m. = matéria seca (* g·100 g^{-1} d.m; ** g·100 g^{-1}; ***massa%)

FONTE: A autora (2017).

O objetivo do trabalho apresentado por Martínez *et al.,* (2012), foi determinar as propriedades químicas, tecnológicas e *in vitro* da casca do fruto, da casca e mucilagem das sementes do cacau, para estabelecer o potencial de uso como fonte de fibra dietética para enriquecer alimentos. Nesse trabalho apresentam-se resultados das diferentes frações do fruto do cacau ("*complejo nacional x trinitário*") cultivado nas zonas de Taura e Cone, localizadas no Equador. Já, Ofori-Boateng e Lee (2013), utilizam a casca para mostrar seu potencial como base sólida catalítica para a transesterificação de óleo de soja em biodiesel. A matéria prima utilizada por eles é proveniente de Gana. Por outro lado, o trabalho publicado por Mansur *et al.,* (2014), pretende viabilizar o uso da casca de cacau proveniente do ocidente da Indonésia, como material base para a produção de químicos, uma vez que passa por um processo de pirólise. O objetivo de Vriesmann *et al*., (2011) foi pesquisar sobre a utilidade da casca de cacau (proveniente da Bahia, Brasil) como matéria prima para a obtenção de pectinas. Porém, os estudos dedicados à descrição e aplicação da casca de cacau, mesmo que poucos, trazem informações de grande utilidade para o planejamento de novas pesquisas.

2.1.5. *Tipos de pré-tratamento para material lignocelulósico*

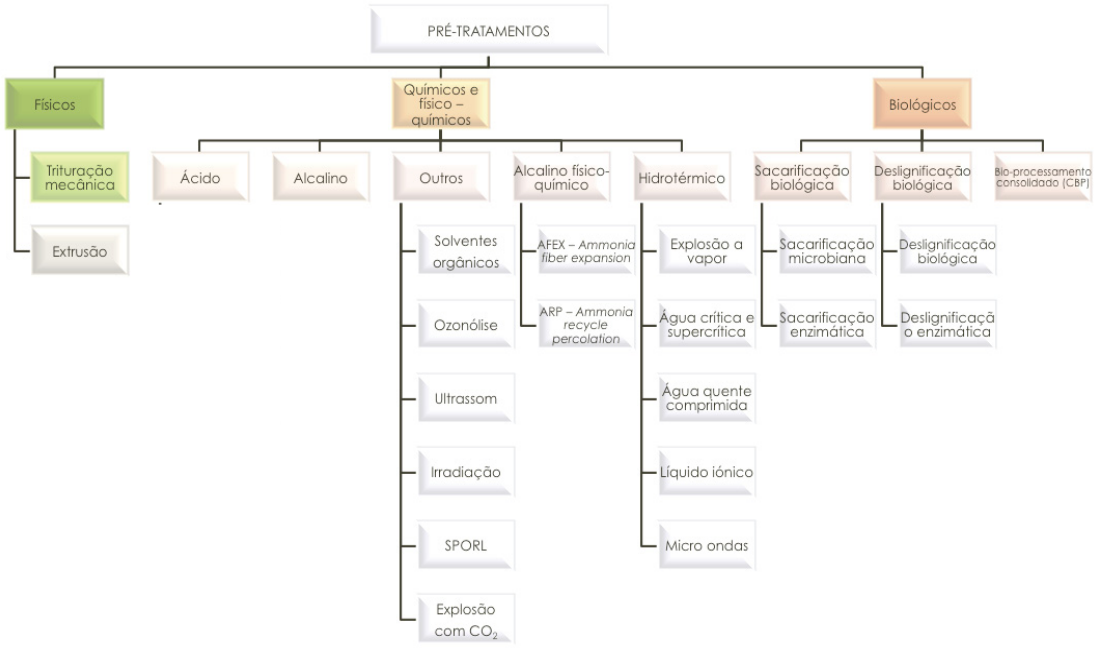
A casca do fruto de cacau pode ser considerada como biomassa agrícola residual primária. É biomassa de natureza lignocelulósica, constituída por três frações principalmente: celulose, hemicelulose e lignina, além da presença de compostos como material inorgânico (cinzas), proteínas entre outros, em menores quantidades. Esta composição, permite considerar o resíduo como matéria prima de baixo custo para outros processos de obtenção de compostos que comercialmente possam ser considerados de maior valor agregado. A lignina é um polímero ramificado conformado principalmente por compostos aromáticos. A hemicelulose é um copolímero de pentoses e hexoses. Finalmente, a celulose é um polímero de glucose que pode ser transformada para o posterior uso dos monómeros em fermentações para a geração de diversos compostos de valor agregado (Brar *et al.,* 2014).

Com o intuito de aproveitar o conteúdo de compostos químicos da casca do cacau, a separação das frações do material lignocelulósico é uma etapa transcendental para a transformação deste resíduo, considerado neste estudo como matéria prima. Mediante a implementação de diferentes técnicas de pré-tratamento (físico, químico, biológico e misturas entre estes) se faz possível a obtenção dos componentes de interesse.

Os tipos de pré-tratamentos implementados em materiais lignocelulósicos são apresentados na Figura 8. Estes tratamentos podem ser classificados como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Cada uma destas estratégias de pré-tratamento têm uma subclassificação que

varia nas técnicas, compostos e microrganismos utilizados para a obtenção das frações requeridas provenientes do material lignocelulósico.

FIGURA 8. PRÉ-TRATAMENTOS PARA A SACARIFICAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO



FONTE: A autora (2017).

Para o presente estudo, o levantamento bibliográfico realizou-se com base em pesquisas feitas para a produção de bioetanol a partir do material lignocelulósico, com o objetivo de comparar os tipos de pré-tratamento e os rendimentos obtidos.

Esta revisão permitiu determinar que partindo de material lignocelulósico (como é a casca de cacau) considerado como resíduo agroindustrial, os melhores rendimentos apresentavam-se quando se aplicava sucessivamente um pré-tratamento mecânico e químico com reativos de natureza alcalina, tais como o hidróxido de sódio, cálcio e potássio ou com amônio. No Quadro 1, são apresentados os rendimento da sacarificação de material lignocelulósico de origem diversa, efetuados com diferentes compostos químicos de natureza alcalina, em variadas concentrações e tempos de processamento. Estes rendimentos podem estar na faixa de 30% - 92%.

Como exemplo da aplicação deste tipo de tratamento em material lignocelulósico, Kim *et al.,* (2015), apresentam condições de reação para o pré-tratamento alcalino, nas quais os intervalos de concentração do reagente varia entre 0,5 e 10% em temperaturas de processamento entre 60 e 180 ˚C, considerando relações entre 10 e 30% (m/v). Nestas faixas de processamento, eles reportam

50% de dissolução da hemicelulose, entre 60 e 80% de deslignificação e taxas importantes de reação, mas com dificuldades na recuperação do NaOH.

QUADRO 1. ESTUDOS DE PRÉ-TRATAMENTOS ALCALINOS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Pré-tratamento		Condições de processo			Matéria prima	Frações removidas			Rendimento de açúcares	Rendimento de etanol	Referência
		Temperatura (°C)	Concentração	Tempo		Lignina	Hemicelulose	Celulose			
Alcalino	Amônio	170	2,5 - 20%	60 min	Palha de milho	60-80%	-	-	-	-	Sun *et al.*, 2002
	Hidróxido de amônio +PEG 4000	160	28% 3%	60 min	Bagaço de cana	-	-	-	35,01±1,53	73%	Cao *et al*., 2013
	$Ca(OH)_2$	121	100 mg/g palha	60 min	Palha de arroz	-	-	-	32%	$9,8 \pm 0,5\ g \cdot L^{-1}$ (SHF) $11,0 \pm 1.0\ g \cdot L^{-1}$ (SSF)	Saha and Cotta, 2008
	NaOH	25	6% carga química, g/g de palha de arroz seca	24 h	Palha de arroz	-	-	-	85%	-	Zheng *et al*., 2009
	NaOH	120	1%	30 min	Capim-elefante	88,40%	68,5% recuperado	96,9 % recuperado	82%	26,05 g/L	Eliana *et al*., 2014
	NaOH	90	0,50%	1 h	Capim-swith	-	-	-	31%	-	Nlewem *et al*., 2010
	NaOH	150	10%	30 min	EFB	-	-	-	87% -	76% 97%	Dahnum *et al., 2015*
	NaOH	30	1%	48 h	Palha de arroz	-	-	-	92,6%	-	Cabrera *et al.*, 2014
	NaOH	100	1 N	30 min	Bagaço de cana	59,1%	-	40%		-	Maryana *et al*., 2014
	NaOH	60	0,5 N	24 h	Bagaço de cana	-	-	-	70,7%	-	Rivers *et al.*, 1984
	NaOH	121	0,5 – 2,0	60 min	Cevada e palha de trigo	20 - 85%	7 - 40%	70-90%		-	Chen *et al*., 2007
	H_2O_2 NaOH	25 - 35	0 – 4,3	3 – 24 h	Palha de trigo	-	-	-	56% açúcares totais	-	Saha and Cotta, 2006
	H_2O_2 NaOH	50	2%	2,5 h	Palha de trigo	14 - 15	13-Aug	31-40		-	Sun *et al*., 2004
	H_2O_2 NaOH	30	1%	24 h	Palha de arroz	-	-	-	91,9%	-	Cabrera *et al*., 2014
	NaOH NaOH/ureia	15/23/60	1-12% 1-7% /12%	2-24 h	Chips de abeto	19%	40%	91%	70%	-	Zhao *et al*., 2008

FONTE: A autora (2017).

Da mesma forma, McIntosh e Vancov (2010), reportam condições de pré-tratamento com diferentes compostos alcalinos incluído o NaOH, em concentrações de 2% à temperatura de 60 ˚C e entre 90 minutos de processamento, obtendo um incremento de 4,3 vezes de açúcares totais.

Os artigos revisados indicam que tratamentos com reagentes alcalinos, são fáceis de efetuar e seguros para quem os realiza; da mesma forma, os compostos alcalinos têm um custo menor no mercado comparado com os reagentes ácidos, além de serem algumas vezes menos corrosivos. Em conclusão, a hidrólise alcalina para o pré-tratamento da casca de cacau (com posterior sacarificação enzimática) e seguido aproveitamento do hidrolisado na produção de biomoléculas de interesse comercial, é uma opção viável e por isso implementada neste estudo.

2.2. Glicerol

O glicerol (também nomeado de glicerina) é um subproduto indesejável do processamento do biodiesel. Para cada 10 kg de biodiesel produzido a partir de óleo vegetal, aproximadamente é gerado 1 kg deste subproduto (Knothe *et al*., 2015). Em 2015 o comércio internacional do glicerol atingiu um total de 25.814 milhões de dólares e os principais países exportadores são Arábia Saudita, Estados Unidos e Singapura (ITC, 2017). Em 2015, o Brasil gerou 347 mil m^3 de glicerol a partir da produção de biodiesel, segundo o informe publicado pela Agencia Nacional do Petróleo (ANP, 2016). Como glicerina bruta, tem sido comercializado com um valor de 220 R$/tonelada em

2017, segundo os indicadores de preços reportado pelo Centro de Referência da Cadeia de Produção de Biocombustíveis para a Agricultura Familiar do Brasil.

A expansão do mercado de biodiesel conduziu a um incremento na quantidade de glicerol gerado e disponível no mercado. Como exemplo disso, no Brasil durante o período de 2006 - 2015 a produção de glicerol teve um incremento de 97,3%, coincidindo com o aumento da produção nacional de biodiesel, que no mesmo período teve uma percentagem de variação de 98,2%. Como subproduto, o glicerol precisa ser utilizado e aproveitado da melhor maneira possível, pois sua utilização em outros processos é mais desejável ambiental e economicamente do que descartá-lo.

Este composto é muito versátil e amplamente utilizado em nível industrial, devido às suas características físico-químicas, fácil manuseio e alta compatibilidade com muitas outras substâncias, pois é miscível em água e álcool. Não é tóxico para a saúde humana nem para o meio ambiente, não é irritante, é viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com um alto ponto de ebulição (290°C). Quimicamente pode ser classificado como um álcool tri-hidratado e é obtido por saponificação, hidrólise ou transesterificação de gorduras e óleos (SDA, 1990).

Segundo a *National Biodiesel Board* (2013), dentre as indústrias que utilizam o glicerol encontram-se: as de bebidas e alimentos (como produto intermediário; para umedecer, adoçar ou preservar os produtos); as de cosméticos e artigos de limpeza pessoal (usado como agente umectante e emoliente); as de fabricação de papel e manufatura de tintas (para amaciar e reduzir o encolhimento durante a fabricação do papel); a têxtil (usado para dimensionar e suavizar fios e tecidos e para lubrificar muitos tipos de fibras em operações de fiação, tricô e tecelagem); as de fabricação de dinamite; as de produção de tabaco (utilizado como umectante, amaciante e para prevenir a quebra e desintegração durante o processamento); e as indústrias farmacêuticas (como composto de cápsulas e recobrimentos, como emoliente e como veículo de antibióticos e antissépticos).

Pesquisas científicas em desenvolvimento tentam ampliar as aplicações benéficas alternativas do glicerol. O campo da biotecnologia por sua vez, tem achado aplicações para o uso deste composto como fonte de carbono nos processos de fermentação para a produção de compostos de relevância econômica como o etanol e o hidrogênio (Peiter *et al.,* 2016).

Dentre os compostos produzidos utilizando o glicerol, encontra-se também o AP (Zhuge *et al*., 2014). Uma das características mais importantes para considerar sua aplicação na produção de biomoléculas através do uso de microrganismos e pelo qual foi considerado como substrato neste estudo, é seu potencial de redução químico (k=4,7) que comparado com o grau de redução da glucose ou da xilose (k=4) por exemplo, promove a produção de metabólitos mais reduzidos (Zhang *et al*., 2015). Isto provoca uma fermentação com menor geração de subprodutos, tais como o ácido

acético (Clomburg e Gonzalez., 2013), o que é conhecido como fermentação homo-propiônica (Dishisha, *et al*., 2012). Desta forma e segundo Barbirato *et al*., (1997), que foram uns dos primeiros em utilizar este substrato para produção de compostos por meio de processos fermentativos, o glicerol pode ser considerado como um melhor substrato do que as fontes de carbono tradicionais até a data já utilizados para a produção de AP.

2.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são um grupo de compostos, cuja principal característica química é possuir na sua estrutura, um grupo funcional carboxila ($COOH^-$), que proporciona a respectiva acidez (Theron e Lues, 2010). Os ácidos de natureza orgânica, são produtos finais ou intermediários do metabolismo biosintético celular primário (Schaechter, 2009). Mesmo que a produção da maioria de ácidos orgânicos seja realizada industrialmente tanto por rotas sintéticas químicas quanto por síntese microbiológica, nos últimos anos os processos fermentativos têm ganhado preferência no mercado. O processo fermentativo é uma etapa fundamental na produção dos ácidos orgânicos e tanto a fermentação submersa quanto em estado sólido, têm sido aplicada industrialmente. Esta última apresenta especialmente a vantagem de utilizar substratos alternativos, de baixos custos e disponíveis em grandes quantidades, sendo os resíduos agrícolas os ideais para o estabelecimento de processos em escala industrial (Pandey *et al.*, 2008).

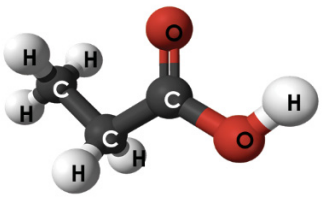
Dentre os ácidos orgânicos de maior relevância encontram-se os ácidos acético, ascórbico, benzóico, cítrico, fumárico, lático, málico, propiônico, succínico, dentre outros (Theron e Lues, 2010). A aplicação de ácidos orgânicos e seus derivados, engloba uma grande quantidade de indústrias incluído o uso como moléculas intermediárias na produção de polímeros, e na indústria alimentícia, pois são empregados como acidulantes e conservantes, devido às suas propriedades antimicrobianas e bacteriostáticas (Davidson *et al*., 2005). Devido a esta mesma caraterística, chegam a ser importantes na indústria de fabricação de ração animal, conseguindo, além de proteger os produtos do ataque de microrganismos indesejáveis, preservar o valor nutricional da ração, garantindo a saúde intestinal de suínos e aves, assegurando melhores rendimentos na criação das espécies obtendo finalmente uma maior rentabilidade. Na indústria de elaboração de alimentação animal os principais ácidos utilizados são os ácidos propiônico, fumárico, fórmico e láctico (Feedinfo, 2014).

2.3.1. *Ácido propiônico (AP)*

O ácido propiônico – AP (ácido propanóico $C_3H_6O_2$) é um ácido mono-carboxílico fraco, de aparência líquida e transparente, de odor rançoso, sem cor e corrosivo. As principais propriedades físicas e químicas deste composto são apresentadas no Quadro 2.

QUADRO 2. PROPRIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS DO AP

Acidez (pKa):	4,87
Viscosidade:	1,09 cP
Massa molecular:	74,08 g/mol
Ponto de ebulição:	141°C
Ponto de fusão:	-21°C
Densidade relativa:	0,99 g/cm^3 (20°C)
Solubilidade:	Miscível em água, etanol, éter e clorofórmio.
Pressão de vapor, 20 °C:	2,4 mmHg
Ponto de fulgor:	54°C
Classificação:	Ácido carboxílico
Formula molecular:	$C_3H_6O_2$ / CH_3CH_2COOH



FONTE: Adaptado de DOW (2015).

2.3.1.1. Contexto histórico

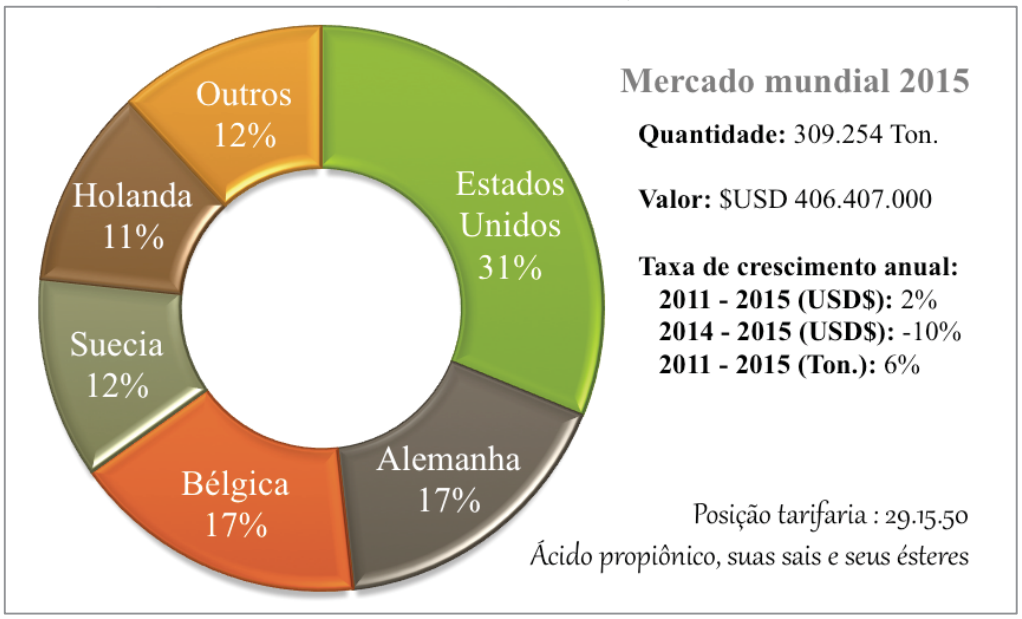
Existem relatos sobre o AP desde 1844, quando Johann Gottlieb identificou pela primeira vez sua produção por via bacteriana a partir da degradação de açúcares (Schaechter, 2009). Posteriormente, outros químicos tentaram sua produção por síntese química, sem resultados satisfatórios, pois não conseguiam obter a mesma substância. Três anos depois o químico Jean-Baptiste Dumas identificou que todas as tentativas de produção daquele composto, tinham produzido uma mesma substância que finalmente foi nomeada como AP.

É reportado também que, em 1941, Walter Reppe estabeleceu a síntese do AP a partir de etileno o que permitiu que a produção industrial começasse a ser desenvolvida rapidamente. Já por volta de 1960, a multinacional BASF ativou a primeira planta de manufatura de AP em grande escala. Atualmente essa empresa é uma das principais empresas produtoras em nível mundial e, desde 2008 conta com uma capacidade atual de produção anual de 110.000 toneladas (BASF, 2008).

2.3.1.2. Produção e mercado

As exportações de AP durante 2015 atingiram um total de 309 mil toneladas correspondentes a um total de 406 milhões de dólares, segundo as informações de comércio internacional publicadas em 2017 (ITC, 2017). Os principais países exportadores deste produto são Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, Holanda e Suécia, os quais agrupam 88% em valor, das exportações mundiais, conforme se vê na Figura 9. A taxa de crescimento anual entre 2011 e 2015 foi de 2% em valor e de 6% em quantidade; enquanto que, para o período 2014-2015 apresentou um decréscimo de 10% em seu valor.

FIGURA 9. COMÉRCIO INTERNACIONAL DO AP, SUAS SAIS E SEUS ÉSTERES.



FONTE: dados ITC. Ilustração: A autora (2017)

Por outro lado, os principais países importadores do produto representados em valor (USD$) são Bélgica (12,3%), Holanda (8,2%), Espanha (7,1%), Estados Unidos (5,5%) e Brasil (5,2%). Em 2015, as importações de AP do Brasil representaram 5,2% do total mundial em valor com USD$ 22,287 milhões e 4,53% do total mundial em quantidade com 13,913 toneladas. O Brasil tem apresentado uma taxa de crescimento anual em valor entre 2011 – 2015, igual a 12%. Brasil não produz atualmente este composto, por isso suas exportações são desprezíveis (ITC, 2017).

Empresas como *BASF*, *Dow*, *Eastman Chemical Company*, *Perstorp*, *A.M. Food Chemicals*, Biomin Holdings Gmbh, *Krishna Chemicals* and *Macco Organiques* são reconhecidas por serem as principais produtoras e comercializadoras do AP em nível mundial (Feedinfo, 2014).

2.3.1.3. Biossíntese do ácido propiônico

Desde o descobrimento dessa substância em 1844, a produção de AP foi direcionada totalmente para síntese química. As principais vias de síntese química utilizadas industrialmente são o processo de Reppe (partindo de etileno, monóxido de carbono e vapor); o processo de Larson (partindo de etanol e monóxido de carbono, usando trifluoreto de boro como catalisador) e o processo de Fischer-Tropsch, por oxidação de propionaldeído como subproduto na síntese de combustível (Furia, 1973).

Apesar de atualmente a totalidade do AP ser produzido industrialmente a partir de síntese química, as pesquisas relacionadas com a produção por meio de processos fermentativos, cresceu significativamente durante os últimos anos. Como foi descrito previamente na introdução, a preocupação pela dependência do petróleo motiva a desenvolver novas tecnologias para implementar de maneira eficiente e competitiva bioprocessos alternativos que proporcionem soluções ambientalmente favoráveis e sustentáveis.

Dentre as principais desvantagens que apresenta a produção industrial do AP por meio de fermentação podem ser mencionadas: i) as baixas produtividades quando implementado o sistema de fermentação em batelada (Parizzi *et al*., 2012): < 1 $Kg \cdot m^3 \cdot h^{-1}$.; ii) as baixas concentrações: <50 $kg \cdot m^{-3}$; iii) a inibição dos microrganismos ocasionada pelo produto (Zhu *et al*., 2010); iv) a geração de outros produtos em concentrações consideráveis durante a fermentação (ácido acético, succínico, lático, pirúvico, málico, fumárico, isovalérico e fórmico, propanol e CO_2) e finalmente v) é um processo com alta demanda de energia para os processos de *downstream* (Rodríguez *et al*., 2014) o que incrementa significativamente os custos de produção. A produção do propionato apresenta a seguinte estequiometria de acordo com a rota da glicólise e o ciclo de Wood-Werkman (Rodríguez *et al*., 2014):

$$1{,}5\ \text{Glucose} + 6\ \text{ADP} + 6\ P_i \rightarrow \text{Acetato} + 2\ \text{Propionato} + CO_2 + 6\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Cabe citar que entre dos rendimentos obtidos nas pesquisas mais recentes, são reportados valores entre 0,59 e 0,72 mol de AP por mol de glicerol, utilizando diferentes biorreatores com células imobilizadas e células livres (Dishisha *et al*, 2012). Igualmente, variando as concentrações de fontes de carbono (glicerol) são obtidos rendimentos que estão entre 0,4 e 0,79 gramas de AP por grama de glicerol para sistema em batelada e de 0,40 e 0,56 gramas de AP por grama de glicerol quando implementado o sistema de batelada alimentada (Zhu *et al*., 2010).

2.3.1.4. Microrganismos usados para a produção de AP

A biossíntese do AP é efetuada por diferentes microrganismos pertencentes aos gêneros *Clostridium, Fusobacterium, Selenomona, Megasphaera* e *Propionibacterium*, sendo este último um dos mais referenciados nas pesquisas. Dentre as espécies mais citadas desde gênero encontram-se as *Propionibacterium freudenreichii, acidipropionici, jensenii e thoenii*, conhecidas como "*Dairy propionic acid bacteria*" (Turgay *et al*., 2016) e *P. shermanii*, as quais desenvolvem o processo em condições de anaerobiose. Para este trabalho, o microrganismo considerado será do gênero *Propionibacterium*, bactéria com forma bacilar, não ciliada, Gram positiva, não esporulada, anaeróbia facultativa ou aerotolerante (Parizzi *et al*., 2012).

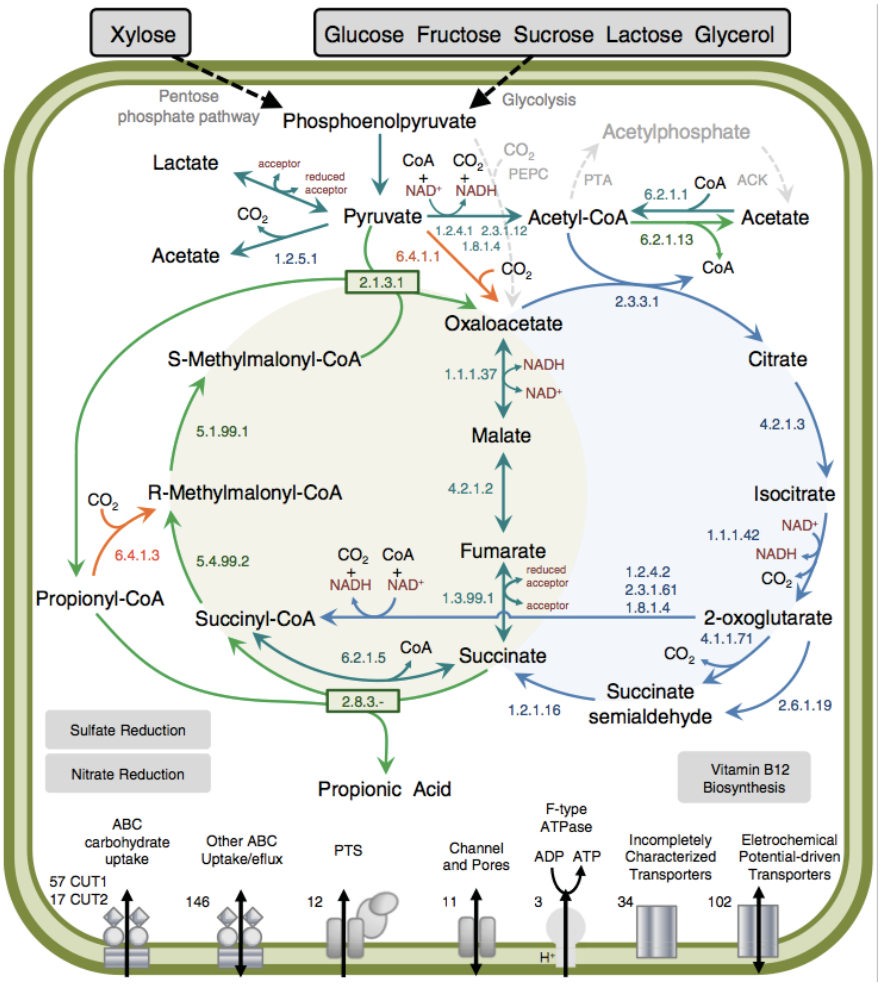
2.3.1.4.1. Metabolismo de produção e requerimentos nutricionais

Com relação à composição do meio de produção, as pesquisas desenvolvidas atualmente apresentam como compostos básicos o extrato de levedura, tripticase/triptona, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio tanto para o pré-cultivo ou desenvolvimento do inóculo, como para o meio de fermentação (Goswami e Srivastava, 2000). Cabe ressaltar que, o escalonamento industrial do processo utilizando estes compostos como parte do meio de produção tornariam sua implementação inviável, pois os custos destes representariam uma alta porcentagem do custo total de produção.

Como fontes de carbono têm sido avaliados diferentes compostos, uma vez que os microrganismos utilizados aceitam uma ampla variedade destes componentes que são transformados através da rota metabólica de ácidos dicarboxílicos (Figura 10).

Dentre os compostos que se destacam encontram-se o glicerol, glucose, lactato, sucrose e xilose, resíduos agroindustriais como os resíduos de polpa de madeira, glúten de milho, soro de leite, hidrolisados de amido, águas residuais com sulfitos, material lignocelulósico, entre outros (Parizzi *et al*., 2012). Todos são utilizados com o objetivo de diminuir os custos de produção, tendo como principais características o custo baixo ou inexistente, a disponibilidade (em grandes quantidades e de forma constante ao longo do ano), além de fornecer altos rendimentos e facilidade de processamento. Como foi mencionado previamente, o glicerol tem sido considerado como uma matéria prima promissora para ser amplamente utilizada como fonte de carbono na obtenção do AP por via biológica (Zhang *et al*., 2015), pois apresenta todas as características necessárias e citadas anteriormente.

FIGURA 10. VISÃO GERAL DO METABOLISMO DE *Propionibacterium acidipropionici*



FONTE: Parizzi *et al*., (2012)

Diferentes sistemas de fermentação têm sido testados na escala de bancada com o propósito de estabelecer as condições e parâmetros ótimos de processo. Inúmeros trabalhos referenciando a implementação de sistema em batelada, batelada alimentada, fermentação extrativa, biorreatores de membranas, leito fibroso entre outros (Pandey *et al*., 2015), mostraram bons resultados na produção do AP. No Quadro 3 são apresentados alguns exemplos dos estudos realizados ao respeito.

QUADRO 3. ESTUDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE AP MEDIANTE DIFERENTES SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO E USO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Fonte de carbono	Sistema de fermentação	Microrganismo	Ácido propiônico $g \cdot L^{-1}$	Y p/s	Produtividade $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	Referência
Glucose de bagaço de mandioca/Glicerol	Batelada	P. *freudenreichii* subsp. *Shermanii* DSM 4902	-	0,57	0,25	Wang *et al*., 2013
Glucose/Glicerol	Batelada alimentada	P. acidipropionici ATCC4965	29,2	0,57	0,15	Liu *et al*., 2011
Glucose de casca de cacau/Glicerol	Batelada, células livres	P. *Jensenii* DSM 20274	10,28	0,59	0,079	Este trabalho
Glicerol	Batelada	*P. Freudenreichii*	9	0,58 mol/mol	0,18	Himmi *et al.*, 2000
	Batelada	*P. acidopropionici*	12	0,79 mol/mol	0,42	Himmi *et al.*, 2000
	FBB (Batelada alimentada)	*P. acidopropionici*	44,62 ± 1,12	0,56 ± 0,027	0,20 ± 0,0075	Zhu *et al*., 2010
	FBB	*P. acidipropionici mutant ACK-Tet*	106	0,54 - 0,71 g/g	0,026	Zhang *et al*., 2009
	Batelada, células imobilizadas	*P. acidipropionici NRRL B-3569*	13	0,49	0,88	Wallenius *et al*., 2015
	Batelada alimentada	*P. jensenii ATCC 4868*	26,95 ± 1,29	-	0,118 ± 0,006	Liu *et al*., 2016
	Batelada e batelada alimentada	*P. jensenii ATCC 4868*	21,43	0,86 g/g	0,112	Zhuge *et al*., 2014
	Batelada, células livres	*P. Thoenii NCDO 1082*	5	0,25	0,03	Boyaval *et al*., 1995
	Batelada alimentada	Mixed culture fermentation	22,6	0,45	0.52 ± 0,07	Chen *et al*., 2016
Glucose	Batelada	P. *acidipropionici* (ATCC 25562)	25	0.54 g/g	0,11 - 0,2	Seshadri *et al.,* 1992
	Células imobilizadas	P. *thoenii* P20	30,41	0,41 g/g	-	Zhong *et al.*, 1998
	Batelada alimentada	P. *freudenreichii* CCTCC M207015	136,23 ± 6,77	-	0,57± 0,03	Chen *et al*., 2012
	Batelada e Batelada alimentada	P *freudenreichii* CICC 10019	62,5	0,78 g/g	-	Wang *et al*., 2012
	Batelada alimentada	P. *acidipropionici* ATCC 4875	53,1	0,41 g/g	0,32	Liu *et al*., 2016
	Batelada	*P. acidopropionici*	8,7	0,53 mol/mol	0,24	Himmi *et al.*, 2000
	Batelada	*P. freudenreichii*	6,4	0,40 mol/mol	0,07	Himmi *et al.*, 2000
Melaço de cana	PFB (Batelada e batelada alimentada)	P. *freudenreichii* CCTCC M207015	41,22 ± 2,06	0,41 g/g	0,34	Feng *et al*., 2011
Hidrolisado de hemicelulose	Batelada	P. *acidipropionici* ATCC 4875	18	0,23 g/g	-	Ramsay *et al*., 1998
Hidrolisado de hemicelulose, melaço de milho	Batelada e batelada alimentada	P. *acidipropionici* ATCC 4875	53,2	-	0,23	Liu *et al*., 2012
Hidrolisado de bagaço de cana	FBB (Batelada alimentada)	P. *acidipropionici* CGMCC 1.2230	58,8	0,37 g/g	0,38	Zhu *et al*., 2012
Hidrolisado de bagaço de cana	FBB (Batelada)	P. *acidipropionici* CGMCC 1.2230	12,9	0,29 g/g	0,88	Zhu *et al*., 2012

FONTE: A autora (2017)

2.3.1.5. Aplicações industriais

O ácido propiônico é utilizado atualmente como sustância pura, na forma do ânion $CH_3CH_2COO^-$ ou na forma de sais ou ésteres conhecidos como propionatos, em diferentes indústrias. Por um lado, as indústrias de alimentação humana e fabricação de ração animal utilizam o AP devido às suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Por outro lado, as indústrias de plásticos, perfumaria e farmacêutica, utilizam este insumo como composto promotor de reações dentro do processo de fabricação (Schaechter, 2009).

Na agricultura e na indústria de fabricação de ração animal, este composto apresenta os benefícios listados na Figura 11.

FIGURA 11. APLICAÇÃO DO AP NA AGRICULTURA E NA FABRICAÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL

FONTE: Adaptado de BASF (2008)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Levantamento de informação – Revisão bibliográfica*

Durante o desenvolvimento deste trabalho, realizou-se uma busca constante de referências bibliográficas relacionadas com os procedimentos, técnicas, conceitos e temas que permitiram encaminhar adequadamente a pesquisa. Dessa forma, em três momentos específicos, foi preciso desenhar e efetuar a busca exaustiva de informação com o propósito de conhecer a fundo o estado de arte dos seguintes temas: 1. Uso da casca de cacau; 2. Tratamentos de sacarificação para material lignocelulósico e 3. Produção de ácido propiônico (AP).

A seguir, à título de exemplo, descreve-se a metodologia utilizada para a busca de informações relacionadas com o tema de produção de AP. A revisão bibliográfica foi conduzida na base de dados de revistas científicas indexadas *Science Direct* (https://www.sciencedirect.com/), usando a seguinte combinação de palavras chave no campo "*all fields*": "*fermentation*", "*propionic acid*", "*production*" e "*biotechnology*". A busca resultou em 2020 artigos; destes, 440 artigos foram publicados antes de 1997, e os restantes 1580 no período de 1998 até 2017. Após a revisão descrita previamente, foi realizada uma busca avançada aplicando filtros para depurar os resultados obtidos, com o objetivo de selecionar apenas os artigos mais relevantes relacionados com o tema. A busca foi refinada em duas etapas utilizando-se a opção "*advanced search*" e preenchendo os campos "*title*" e "*abstract-title-keywords*". Primeiramente, de acordo com o título da publicação (*title*), selecionando as seguintes palavras: "{*propionic acid*}" usando o conector "*AND*" e "*production*". Em seguida, combinando os resultados com o conector "*AND*" seguido do campo "*abstract-title-keywords*" preenchendo o espaço da seguinte maneira: [*biotechnology OR Propionibacterium AND fermentation AND NOT* {*vitamin* B12} *OR cheese OR yogurt*]. Utilizando o conetor "*AND NOT*" os termos que se encontram depois dele, são excluídos automaticamente da pesquisa. As palavras aqui excluídas estão relacionadas com áreas de fabricação de alimentos ou farmacologia, as quais não aportam maior informação para o trabalho atual.

Uma primeira triagem foi realizada com base na leitura do título de cada um dos artigos que atenderam aos critérios de seleção estabelecidos previamente. Para os títulos que não apresentaram nenhum dos termos da busca, foi feita uma verificação no resumo/conteúdo do documento. Se efetivamente este não estava relacionado com o tema em questão, o artigo foi excluído. Desta forma, o refinamento da pesquisa inicial mostrou como resultado final 14 documentos, cujo conteúdo foi considerado útil uma vez feita a leitura dos mesmos. Com os documentos selecionados, elaborou-se uma base de dados com a informação chave contida nos artigos (objetivos, métodos, resultados, etc.), o que facilitou o uso e eficaz e posterior consulta das

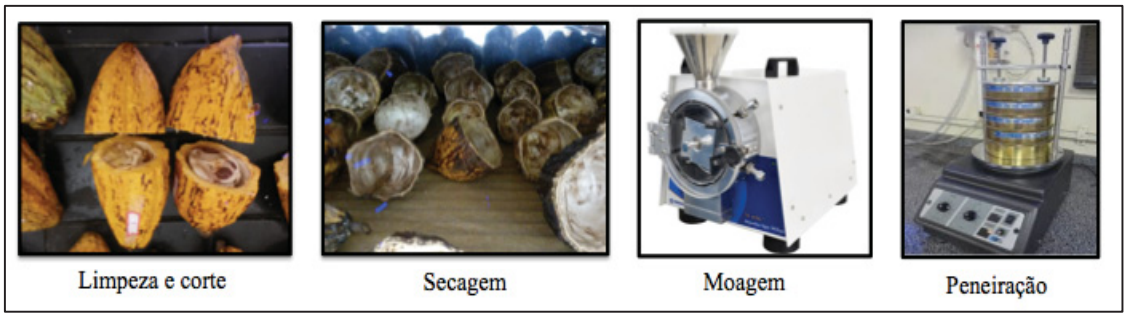
informações obtidas. Procedimentos similares foram efetuados para os outros temas relacionados com esta pesquisa.

3.2. *Recebimento e acondicionamento da casca de cacau*

Os frutos de cacau empregados neste estudo foram recebidos da região de produção do Pará, graças ao apoio das Universidades parceiras, Universidade Federal do Pará e Universidade Federal da Bahia da rede de pesquisa do projeto CAPES PROCAD 2013 - Biocau. Uma vez que os frutos do cacau chegam às instalações da UFPR, verificava-se visualmente o estado externo da casca do fruto procurando algum tipo de lesão mecânica ou ocasionada pela ação de microrganismos desenvolvida durante o transporte. Os frutos em bom estado físico, eram então lavados cuidadosamente e abertos fazendo-se um corte transversal mediante uso de facas, para a extração imediata das amêndoas.

Em seguida, aplicou-se a metodologia estabelecida na norma NREL/TP-510-42620 (Hames *et al.,* 2008) de preparação das amostras para posterior análise de composição e uso do material. Inicialmente a casca passou por um processo de secagem a 45 ± 3°C durante 48-72 horas. Posteriormente o material seco foi triturado manualmente, para depois ser processado no moinho elétrico de facas Marconi-MA 580/E. Peneirou-se o material com tamanho reduzido, para posterior utilização da fração com tamanho de partícula entre 0,84 – 2,00 mm, remanescente na malha USS/ASTM No. 20. Em todas as análises descritas a seguir, empregou-se o material com o tamanho de partícula aqui descrito. A Figura 12 ilustra as etapas do processo até aqui descritas.

FIGURA 12. ETAPAS DE ACONDICIONAMENTO DA CASCA DO CACAU



FONTE: A autora (2017)

3.3. *Caracterização físico-química da casca de cacau*

O primeiro e mais importante processo a ser realizado cada vez que foi recebido um lote de matéria prima, foi a caracterização da mesma, com o intuito de predizer, dentre as etapas

posteriores do processo, possíveis alterações que influenciem os parâmetros de rendimento ou produtividade ou até mesma a qualidade do produto final. A caracterização físico-química da matéria prima, forneceu informações importantes sobre composição elementar, e permitiu acondicionar adequadamente o material antes de iniciar o processo de produção. Particularmente, o material de origem biológica apresenta maiores variações devido à grande quantidade de variáveis que influenciam sua composição durante o desenvolvimento do organismo. No caso da planta do cacau, dentre os fatores que influenciam a composição final da casca neste caso específico, encontram-se a variedade da planta, a composição do solo, o manejo fitossanitário da lavoura, as temperaturas e umidade apresentadas durante o desenvolvimento da planta, a quantidade de água recebida durante o crescimento, os nutrientes fornecidos durante a cultura e o manuseio durante e após da colheita. Por estes motivos, procurou-se realizar as análises básicas de caracterização da casca com a chegada de cada lote de material novo.

Considerando a natureza sólida da biomassa a analisar, precisou-se da preparação de um extrato aquoso para o desenvolvimento de alguns dos procedimentos próprios da caracterização que serão descritos a continuação. Desta forma, para o acondicionamento da casca e posterior obtenção deste extrato aquoso, adicionou-se 1 g de casca de cacau em 50 mL de água deionizada contidos em um copo de Becker. Durante 10 minutos a mistura foi aquecida em banho-maria com agitação magnética constante do conteúdo e depois, foi esfriada até atingir a temperatura ambiente. Transferiu-se cuidadosamente o conteúdo do Becker para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. Finalmente, filtrou-se a amostra utilizando papel filtro qualitativo e armazenou-se adequadamente em geladeira em temperatura de 4ºC .

3.3.1. *Determinação de umidade, pH, atividade de água (a_w), cinzas, açúcares, íons e proteínas*

- *Sólidos totais e umidade*

Adotou-se a metodologia estabelecida na norma NREL/TP-510-42621 (Sluiter *et al.,* 2008), para a determinação dos sólidos totais e umidade na casca de cacau, como é descrito a seguir. Em estufa a 105 ± 3ºC secou-se o papel filtro qualitativo durante 4 h; em seguida transferiu-se para dessecador até atingir temperatura ambiente. Determinou-se a massa em balança analítica e registrou-se o valor determinado em balança analítica. Sobre o papel filtro seco e tendo tarado a balança, depositou-se 1,0 g de casca de cacau, e levou-se para estufa a 105 ± 3ºC durante 8 h. Em seguida, transferiram-se as amostras para o dessecador até atingir temperatura ambiente. Na sequência, determinou-se as massas das amostras e após atingirem massa constante, registrou-se o

valor determinado na balança analítica, e calcularam-se os valores correspondentes aos sólidos totais e umidade, utilizando a Equação 1 e 2:

$$\%\ \textbf{Sólidos totais} = \frac{(\text{Massa}_{\text{papel +amostra}} - \text{Massa}_{\text{papel filtro}})}{\text{Massa}_{amostra}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 1)}$$

$$\%\ \textbf{Umidade} = 100 - \frac{(\text{Massa}_{\text{papel filtro+amostra}} - \text{Massa}_{\text{papel filtro}})}{Massa_{amostra}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

▪ *Determinação de pH*

Determinou-se o pH do extrato aquoso da casca de cacau, mediante o uso do pHmetro *mPA210* da *MS Tecnopon*. Antes de cada medição, realizou-se a respectiva calibração do equipamento com soluções padrão de pH 4 e 7.

▪ *Determinação da atividade de água (a_w)*

O parâmetro atividade de água (a_w) é definido como a relação da pressão de vapor da água contida no material à pressão de vapor da água à mesma temperatura:

$$a_w = \frac{P_A}{P_{AS}} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Onde PA = pressão de vapor da água no alimento; P_{AS} = pressão de vapor da água pura na mesma temperatura, que deve sempre ser especificada. A atividade de água tem índice que varia de 0 a 1, que quanto mais próximo de 1 for o valor obtido na análise, maior será o teor de água livre. Definiu-se o valor de atividade de água por meio de método direto mediante o analisador *AquaLab CX-2, da Decagon Devices*, Inc., utilizando 3 g de casca de cacau. Calibrou-se o equipamento antes de submeter a teste as amostras, utilizando uma solução padrão de cloreto de lítio 8,5 M e cloreto de sódio 6 M.

▪ *Determinação do teor de cinzas*

Aplicou-se a metodologia estabelecida na norma NREL/TP-510-42622 (Sluiter *et al.,* 2008) para a determinação de cinzas na casca de cacau, como é descrito a seguir. Calcinaram-se os cadinhos de porcelana (devidamente identificados) a ser utilizados para a análise, com o propósito de eliminar possíveis interferentes, colocando-os na mufla à 575 ± 25°C por 4 horas. Transferiram-se os cadinhos após esse tempo para o dessecador até atingir temperatura ambiente. Seguidamente, determinou-se a massa inicial usando uma balança analítica. Os cadinhos com 1,0 g de amostra de casca de cacau, previamente medida em balança analítica, foram levados para mufla a 575 ± 25°C durante 6 horas, verificando-se que a amostra no final do processo, adquirisse coloração branco/acinzentada. Após a calcinação das amostras, os cadinhos foram transferidos para o

dessecador até alcançar temperatura ambiente. Finalmente foi determinado e registrado a massa dos cadinhos com as amostras em balança analítica. A porcentagem de cinzas da amostra foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\% \textbf{ Cinzas } = \frac{(\text{Massa final}_{\text{cadinho+amostra}} - \text{Massa inicial}_{\text{cadinho}})}{\text{Massa seca da amostra}} \; x \; 100 \qquad \text{(Eq. 4)}$$

▪ *Determinação do teor de açúcares redutores*

Escolheu-se o método de DNS (Ácido 3,5 – dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959), para a determinação de açúcares presentes na amostra devido à faixa de detecção dos açúcares redutores que se presume conter a casca de cacau de acordo com a literatura consultada (Tabela 11). Inicialmente, elaborou-se uma curva padrão com 5 pontos a partir de uma solução mãe de glucose com uma concentração de 1 $g \cdot L^{-1}$ e determinou-se a absorbância a 535 nm no espectrofotômetro *Spectrumlab 22PC*. Posteriormente, realizou-se a hidrólise ácida de uma amostra de casca de cacau para quantificação de açúcares não redutores e para os açúcares redutores, empregou-se o extrato aquoso da casca de cacau.

▪ *Determinação de Íons*

Realizou-se a quantificação de ânions e cátions para cada amostra de extrato aquoso da casca. Para cada análise diluiu-se a amostra de extrato aquoso, na razão de 1:10. Utilizou-se o equipamento *Ion analysis Metrohm CH-9101*. Para a análise de cátions utilizou-se a coluna *Metrosep C3* 250/4.0 (250mmL x 4,0mm ID; No. 5607002), com as seguintes condições de análise: eluente 5,0 mM HNO_3; vazão: 1,0 $mL \cdot min^{-1}$; detector: CD; temperatura 40ºC; volume de injeção: 20 µL. Para a análise de ânions utilizou-se a coluna *Metrosep A Supp* 5 250/4.0 (250 mmL x 4,0 mm ID; No. 7610789), com as seguintes condições de análise: eluente 3,2 mM Na_2CO_3 + 1,0 mM $NaHCO_3$; vazão: 0,7 $mL \cdot min^{-1}$; detector: supressed CD; temperatura ambiente (25ºC); volume de injeção: 20 µL.

▪ *Determinação de proteínas totais*

Para a quantificação de proteínas implementou-se o método proposto por Bradford (1976). Este método é baseado na observação de que o *Comassie Brilliant Blue* G-250 existe em duas colorações diferentes, vermelho e azul. No pH de reação, a interação entre a proteína de massa molecular alta e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente na região de comprimento de onda

no ultravioleta-visível em 595 nm (Zaia *et al.*, 1998). O complexo proteínas-corante tem um coeficiente de extinção alto, proporcionando uma maior sensibilidade na dosagem da proteína.

Elaborou-se a curva padrão usando uma solução padrão de BSA de 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ e analisou-se a absorbância em um comprimento de onda igual a 595 nm no espectrofotómetro *Spectrumlab 22PC*. Posteriormente, analisaram-se as amostras de extrato aquoso de casca de cacau (1 g de casca de cacau em 10 mL de água deionizada) para a quantificação de proteínas solúveis presentes na amostra.

3.3.2. *Determinação de extraíveis em água, etanol e éter de petróleo*

Para a determinação de extraíveis na casca de cacau, adotou-se a metodologia estabelecida na norma NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.,* 2005) descrita a seguir.

a. Preparação da amostra para extração

Com as amostras processadas para a determinação de extraíveis, determinou-se ao mesmo tempo sólidos totais e umidade (procedimentos descritos previamente).

b. Extração pelo método de Soxhlet

Secaram-se em estufa a 105 ± 5ºC durante 12 h, as peças de vidro do equipamento a utilizar. Estas foram transferidas para um dessecador, posteriormente, até atingir temperatura ambiente. Adicionaram-se pérolas de vidro nos frascos de depósito do solvente e registrou-se a massa. A seguir, adicionaram-se 190 ± 5 mL de água deionizada. Imediatamente, adicionaram-se 4,00 g de casca de cacau dentro de cada cartucho de extração, registrou-se a massa e colocou-se dentro do equipamento. Com todas as peças e conexões dispostas corretamente, iniciou-se o processo de extração durante 8 h.

Retirou-se a maior quantidade possível de água antes de montar o equipamento para extração com o próximo solvente. Posteriormente, adicionaram-se 190 ± 5 mL de etanol no frasco de depósito do solvente previamente tarado. Com todas as peças (incluindo o cartucho de extração com a amostra previamente processada com água) e conexões dispostas corretamente, iniciou-se o processo de extração durante 8 h. Repetiu-se o procedimento descrito para a extração com água e realizaram-se os mesmos passos de montagem do equipamento para a extração final com éter de petróleo. Ao final da extração com este último solvente, a amostra restante contida no cartucho transferiu-se para um papel filtro qualitativo previamente seco e com massa conhecida (sendo lavada a amostra com 100 mL de água), e levou-se para estufa a 105 ± 5ºC durante 12 h.

c. Remoção dos solventes

Os solventes foram extraídos dos frascos de vidro mediante evaporação em estufa com circulação de ar. Após de 12 h, os recipientes foram transferidos para o dessecador até atingir temperatura ambiente e em seguida, registrou-se a massa.

Realizaram-se os cálculos de extraíveis da biomassa, empregando as equações 5 e 6:

$$\boldsymbol{ODW} = \frac{(Massa_{Cartucho+amostra} - Massa_{Cartucho}) \times \%\ Sólidos\ totais}{100} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

$$\%\ \textbf{Extraíveis} = \frac{(\text{Massa}_{\text{frasco+extraíveis}} - \text{Massa}_{\text{frasco de vidro}})}{\text{ODW}_{amostra}}\ x\ 100 \qquad \text{(Eq. 6)}$$

3.3.3. *Determinação de carboidratos estruturais e lignina*

Para a determinação de carboidratos estruturais e lignina na casca de cacau, adotou-se a metodologia estabelecida na norma NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.,* 2011) descrita a seguir.

a. Preparação da amostra para análise e hidrólise

Secaram-se os cadinhos durante 4 h em mufla a 575 ± 25°C e após esse tempo, foram transferidos para um dessecador durante 1 h, e determinou-se a massa em balança analítica, sendo registrado a massa (W_1). As amostras foram transferidas de novo para a mufla durante 1 h e, após esse tempo, foram levadas para o dessecador durante 1 h e a massa foi registrada. Este procedimento foi repetido até se atingir o massa constante (variação da massa menor a ± 0,3 mg após de reaquecimento dos cadinhos na mufla). Foram depositadas 0,3 ± 0,01 g de casca de cacau em frascos do tipo *Schott* de 100 mL. Adicionaram-se 3,00 ± 0,1 mL de H_2SO_4 72% e durante 1 min o conteúdo do frasco do tipo *Schott* foi misturado utilizando um bastão de vidro. Os frascos foram dispostos em um banho-maria a 30 ± 3°C para hidrólise durante 1 h, agitando-se o conteúdo do frasco com um bastão de vidro a cada 10 min sem retirá-los do banho-maria. Após esse tempo, retiraram-se os frascos do banho-maria e adicionaram-se 84,00 ± 0,04 mL de água deionizada. Com os frascos fechados adequadamente homogeneizou-se o conteúdo até a separação de fases entre as camadas de concentração alta e baixa dos ácidos desaparecer.

Preparou-se 10 mL de uma solução padrão de açúcares (glucose, xilose, galactose arabinose e manose) que foi posteriormente utilizada para fazer a correção de possíveis perdas ocasionadas durante a hidrólise ácida. Adicionaram-se 348 µL de H_2SO_4 72% nesta solução, e transferiu-se para o frasco do tipo Schott, fechado adequadamente. Levaram-se as amostras à autoclave também a solução padrão de açúcares que foram incubadas durante 1 h a 121°C. Os frascos foram esfriados até atingir a temperatura ambiente.

b. Análise do conteúdo de lignina ácido insolúvel (AIL)

Filtraram-se as amostras através do papel filtro qualitativo previamente seco e de massa conhecida, e adicionaram-se 50 mL de água deionizada. Armazenou-se uma amostra de 50 mL do líquido filtrado para a análise posterior de carboidratos e de lignina solúvel. Transferiram-se os papeis filtro com as amostras filtradas para uma estufa a 105 ± 3ºC. Passaram-se para o dessecador durante 30 min e registrou-se a massa (W_2). Repetiu-se o processo de secagem até atingir massa constante.

Transferiram-se cuidadosamente as amostras para os cadinhos secos e de massas conhecidas. Colocaram-se os cadinhos na mufla a 575 ± 25°C durante 8 h. Completado o tempo, foram passados para o dessecador até atingir temperatura ambiente. Determinou-se a massa e levou-se de volta para a mufla durante 1 h cada amostra, e repetiu-se o processo até atingir massa constante. Registrou-se a massa final como W_3. Calculou-se a porcentagem de resíduos á o conteúdo de lignina ácido insolúvel conforme a Equações 9:

$$\boldsymbol{ODW} = \frac{W_2 \times \%\, Sólidos\ totais}{100} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

ODW: Massa seca em estufa (*Oven dry weight*)

$$\%\boldsymbol{AIR} = \frac{W_2 - W_1}{ODW_{amostra}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 8)}$$

AIR: Resíduo ácido-insolúvel (*Acid Insoluble Residue)*

$$\%\ \boldsymbol{AIL} = \frac{(W_2 - W_1) - (W_3 - W_1)}{ODW_{amostra}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 9)}$$

AIL: Lignina ácido-insolúvel (*Acid insoluble lignin*)

c. Determinação do conteúdo de lignina ácido solúvel (ASL)

Analisou-se uma amostra de água deionizada no espectrofotômetro UV-Visível e considerou-se como branco. A absorbância do extrato da hidrólise foi lida no comprimento de onda UV-VIS de 240 nm. Quando necessário, dilui-se as amostras com água deionizada ou com ácido sulfúrico 4% para obter uma absorbância na faixa de 0,7–1,0 registrando a diluição feita. O mesmo solvente foi utilizado como branco. Este procedimento foi efetuado no período de tempo compreendido entre a hidrólise ácida e até 6 h depois do procedimento. Calculou-se a lignina ácido solúvel conforme a Equação 10.

$$\%\ \mathbf{ASL} = \frac{(\mathrm{UV_{abs}} \times \mathrm{Volume}_{\ \mathrm{filtrado}} \times \mathrm{Diluição})}{\varepsilon \times \mathrm{ODW_{amostra}} \times Pathlength} \times 100 \qquad \text{(Eq. 10)}$$

ASL: Lignina ácido solúvel (*Acid soluble lignin)*
UV_{abs}: Média da absorbância UV-Vis para a amostra a um comprimento de onda apropriado
$Volume_{filtrado}$: Volume do filtrado, 86,73 mL

ε: Absorbância da biomassa para uma longitude de onda específica.
ODW amostra: Massa da amostra em miligramas
Pathlength= comprimento do percurso da cubeta de quartzo

$$\%\ \boldsymbol{Lignina}_{\boldsymbol{livre\ de\ extraíveis}} = \%\mathrm{AIL} + \%ASL \qquad \text{(Eq. 11)}$$

$$\%\ \boldsymbol{Lignina}_{\boldsymbol{como\ recebida}} = (\%\ lignina_{livre\ de\ extraíveis}) \times \frac{(100 - \%\mathrm{Extraíveis})}{100} \qquad \text{(Eq. 12)}$$

d. Determinação de carboidratos estruturais

Preparou-se uma solução padrão de calibração (CVS, *calibration verification standard*) contendo os compostos a ser quantificados (celobiose, glucose, xilose, galactose, arabinose, manose), determinando 4 pontos de calibração.

Transferiram-se 20 mL do extrato da hidrólise (Descrita no parágrafo b.: *Análise do conteúdo de lignina ácido insolúvel*) para um frasco de Erlenmeyer de 50 mL. Neutralizou-se até pH 5-6 utilizando carbonato de cálcio e agitação constante (adicionando-se o carbonato devagar, até atingir pH 4). Deixou-se decantar a amostra. Depois deste processo o pH do líquido permaneceu 7. Preparou-se a amostra para o análise em HPLC, filtrando o líquido obtido na etapa anterior em um filtro de 0,2 µm e transferindo-o para um *vial*. Analisaram-se o padrão de calibração, o CVS e as amostras no equipamento HPLC usando uma coluna *Shodex sugar SP0810* ou uma coluna *Biorad Aminex HPX-87-P*.

3.3.4. *Análise histológica da casca de cacau*

FIGURA 13. FRAGMENTO DE CASCA DE CACAU

FONTE: A autora (2017)

Aplicando técnicas histológicas de coloração, e empregando os corantes safranina (1%) e azul de Astra (1%), identificaram-se as estruturas anatômicas presentes na casca do fruto maduro de cacau.

Iniciou-se o procedimento com um corte de 3 cm de altura por 3 cm de comprimento da casca de cacau fresca (Figura 13). Fragmentos deste material foram submersos em uma solução de etanol 70% para evitar a degradação do material e assim conseguir preservar a aparência original das estruturas. Após 24 h de contato com a solução, a suspensão foi filtrada e retirou-se o excesso remanescente sobre os pedaços com papel toalha. Um fragmento, foi depositado em um recipiente com solução de NaOH 2,3% com o propósito de verificar as modificações estruturais que provocava o composto alcalino sobre as estruturas do material, simulando de alguma forma, o pré-tratamento alcalino desenvolvido neste estudo.

Do corte de casca, usando lâminas de bisturi a mão livre, foram obtidos cortes finos (25 μm de espessura). Em seguida, os fragmentos resultantes foram submersos em álcool durante 10 minutos e lavados com água deionizada duas vezes. Posteriormente, submergiram-se os fragmentos em hipoclorito de sódio comercial diluído durante 2 horas, e na sequência, efetuaram-se duas lavagens sucessivas com água deionizada.

Na sequência, submergiram-se os fragmentos descoloridos durante 1 hora em uma solução diluída de safranina e azul de Astra (misturados na razão de 1:1) . Após este tempo, distribuíram-se os fragmentos sobre lâminas semipermanentes de vidro e cobriram-se com lamínulas para a posterior observação em microscópio ótico (MO) binocular marca *Leica, DM/LS*. (Jensen, 1962). As imagens obtidas foram obtidas através do *software ToupView*.

3.3.5. *Determinação da morfologia por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A morfologia da casca de cacau antes e depois do pré-tratamento básico-enzimático, foi analisada por *Microscopia Eletrônica de Varredura* (MEV) no equipamento *Teskan mod Vega 3 LMO* (*Oxford instruments*), operando a 15 keV, do Centro de Microscopia Electrónica (CME) da UFPR. A montagem das fibras foi efetuada no sentido longitudinal sobre suportes de alumínio e foram fixadas com fita dupla-face de cobre. Previamente à análise, as amostras foram secas em estufa a 45°C durante 4 h e recobriram-se posteriormente com uma fina camada de 30 nm de ouro usando um metalizador em câmara de vácuo.

3.3.6. *Determinação do índice de cristalinidade por difração de raios X*

As análises de difração de raios-X das amostras de casca de cacau com e sem pré-tratamento, foram obtidas mediante um difratômetro *Shimadzu XRD 700 Maxima* e analisadas com a emissão de radiação de Cu (CuKα, λ=1,5418 Å). O equipamento do Laboratório de Ótica e Instrumentação de raios X, do Departamento de Física da UFPR foi utilizado para as análises. Analisou-se o resultado no intervalo do ângulo 2θ entre 5 e 40 graus, com varredura de 2 graus por minuto, e operou-se o gerador a temperatura ambiente em 40 kV e 20 mA. Os resultados obtidos, foram processados pelo *software* analisador de gráficos *OriginLab 7.0* o índice de cristalinidade foi determinado mediante a Equação 13 (Buschle-Diller; Zeronian, 1992).

$$\%I_{CR} = \left(\frac{I_{022} - I_{ma}}{I_{022}}\right) \times 100 \qquad \text{(Eq. 13)}$$

Onde:
I_{CR} = Índice de cristalinidade

I_{022} = Intensidade no plano (022) intensidade máxima de difração
I_{ma} = Intensidade do material amorfo em 2θ = 18°

3.3.7. *Determinação das propriedades térmicas mediante análises termogravimétricas (TG/dTg)*

A estabilidade térmica por termogravimetria (TG) das amostras de casca de cacau com e sem pré-tratamentos, foi analisada no equipamento *Setaram (Setsys Evolution TG / DTA / DSC)* do Laboratório de Biomassa (Biofix) da UFPR, sob atmosfera de N_2 de 20°C até 800ºC e fluxo de gás de 20 $mL \cdot min^{-1}$.

3.3.8. *Determinação de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho (FTIR)*

As amostras de casca de cacau com e sem pré-tratamentos, foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho FTIR em um equipamento Vertex 70 (Bruker), com o acessório DRIFTS (reflectância difusa) com 64 *scaners,* resolução 4 cm^{-1}, sem a eliminação da compensação atmosférica na região entre 4000 a 400 cm^{-1}.

As amostras foram previamente secas a uma temperatura de 45°C durante 24 horas; depois foram moídas e misturadas a homogeneidade em KBr espectroscópico e colocadas em acessórios DRIFTS para a aquisição dos espectros. Os resultados obtidos, foram analisados com o *software OriginLab 7.0.*

3.4. *Determinação das condições de processo para o pré -tratamento químico e enzimático da casca de cacau*

Como é afirmado por Kim *et al*., (2015), o alvo principal de qualquer pré-tratamento aplicado em material lignocelulósico é melhorar a hidrólise enzimática dos carboidratos presentes, para que em consequência a eficiência da bioconversão dos açúcares seja mais eficiente.

Com a informação recopilada durante a revisão bibliográfica sobre os diferentes tipos de pré-tratamento implementados para a disponibilização e obtenção dos açúcares presentes em material lignocelulósico de diferentes origens (lembrando que não existem referências prévias de pré-tratamentos de sacarificação, específicas para o aproveitamento do hidrolisado obtido partir da casca de cacau), procedeu-se a determinação as condições ótimas para o pré-tratamento químico-enzimático da casca de cacau. Desta forma, foi realizado um tratamento químico com hidróxido de sódio (NaOH) na casca de cacau, o qual promove a remoção principalmente de lignina presente na biomassa de natureza lignocelulósica. Segundo os resultados reportados na literatura, existe uma

ampla possibilidade de combinações de fatores como a concentração do NaOH, a concentração de biomassa, os tempos e temperaturas de processamento.

3.4.1. *Planejamento experimental DCCR: condições para o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) da casca de cacau*

O Delineamento Composto Central Rotacional-DCCR realizou-se com o intuito de determinar as melhores condições de tratamento químico das cascas de cacau na concentração fixa de 10% (m/v), utilizando duas variáveis e três pontos centrais, resultando em treze experimentos. As variáveis selecionadas foram: tempo de processamento (30 a 120 minutos) e concentração de NaOH (0,5% a 4,0%) tendo como parâmetro de resposta a quantidade de celulose no material pré-tratado quimicamente. Os níveis das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 2.

Os ensaios descritos no planejamento foram realizados em frascos do tipo *Schott* de volume de 100 mL com tampa, com as concentrações de NaOH especificadas e uma relação de 10% (m/v) em cada caso. Os frascos foram levados a autoclave atingindo uma temperatura de 120ºC durante os tempos estabelecidos no desenho experimental. Terminado o processo na autoclave, permitiu-se que o material atingisse a temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se a casca de cacau pré-tratada, através de papel filtro qualitativo (previamente seco em estufa a 80 ± 3ºC e com massa conhecida). Trasladaram-se os papéis filtro com as amostras para uma estufa a 80 ± 3ºC.

TABELA 2. DCCR - CONDIÇÕES DE OTIMIZAÇÃO PARA O PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DE CACAU

Experimento	NaOH (%)	Tempo (min)
1	1	43
2	1	107
3	3.5	43
4	3.5	107
5	0.5	75
6	4	75
7	2.3	30
8	2.3	120
9 (C)	2.3	75
10 (C)	2.3	75
11 (C)	2.3	75
12 (C)	2.3	75
13 (C)	2.3	75

FONTE: A autora (2017)

Passaram-se para o dessecador durante 30 min e registrou-se a massa. Até atingir massa constante, repetiu-se o processo de secagem. Com o material seco, procedeu-se a realizar a determinação da celulose. Para este fim, utilizou-se a enzima Cellic® CTec 2 em excesso para

retirar completamente o conteúdo de celulose presente na casca e determinar por gravimetria a diferença de massa.

3.4.2. *Determinação das condições de processo para o tratamento da casca de cacau com a enzima Cellic® CTec 2.*

Hidayat *et al*., (2012) afirma que a hidrólise enzimática das ligações glicosídicas entre os monômeros de glucose da cadeia de celulose, é uma etapa transcendental no processamento da celulose proveniente da biomassa vegetal. As formulações de celulase contêm um amplo espectro de enzimas chamadas endoglucanases, celobiohidrolases e ß-glucosidase, que trabalham sinergicamente para converter a celulose em açúcares mais simples (Rodrigues *et al*., 2015). As endoglucanases atuam clivando as ligações ß-glucosídicas internas na cadeia de celulose, permitindo a posterior entrada e ação da celobiohidrolase sobre as extremidades da cadeia. A celobiose produzida é finalmente dividida em unidades de glucose mediante a ação da ß-glucosidase (Yennamalli *et al*., 2013)

Para este estudo foi utilizada a enzima comercial Cellic® CTec 2 da empresa Novozymes A/S (Dinamarca). Segundo o fabricante (Novozymes - Ficha técnica, 2010), esta enzima é uma mistura complexa de celulases agressivas, com um alto conteúdo de ß-glucosidases e hemicelulases. A Cellic® CTec 2 tem um elevado rendimento de conversão, é eficaz em altas concentrações do substrato, tolerante a inibidores, compatível com várias matérias primas e apresenta alta estabilidade.

Tendo como referência as condições de hidrólise enzimática (concentração da enzima, concentração de material lignocelulósico no meio e tempo de processamento) definidas por Campioni (2014) para os EFB (*Empty fruit bunch*) da palma, realizaram-se testes para determinar os parâmetros a serem aplicados para o tratamento enzimático da casca de cacau. No estudo citado as condições de processamento foram 2,4% de concentração para a enzima, 15% (m/v) para concentração de EFB no meio, 39 h de processamento em banho-maria a 50ºC e com uma agitação de 100 rpm, obtendo como resultado um rendimento de 63,5% de conversão da celulose presente no EFB.

As amostras de casca de cacau pré-tratada alcalinamente nas diferentes condições estabelecidas no planejamento experimental, submeteram-se a tratamento com a enzima Cellic® CTec 2 seguindo as etapas descritas a seguir. Em frasco Erlenmeyer de 125 mL adicionou-se uma concentração da enzima Cellic® CTec 2 de 2,4% (v/v) em solução de tampão citrato com pH 4,8, considerando uma relação de 10% (m/v) para a quantidade de casca de cacau pré-tratada alcalinamente, processada durante 24 h e mantendo uma temperatura constante de 50ºC (em banho-

maria) com agitação de 100 rpm. Em seguida, filtrou-se o hidrolisado obtido a partir da casca de cacau através de papel filtro qualitativo e assim, a fração liquida ou hidrolisado, foi utilizado posteriormente como fonte de glucose para a preparação do meio de fermentação.

3.5. *Seleção do microrganismo para produção de ácido propiônico*

Para este trabalho, decidiu-se utilizar os microorganismos do género *Propionibacterium*. Foram utilizados meios diferentes para a reativação das cepas e para a produção do inóculo, como recomendado pela literatura e posteriormente empregou-se um meio sintético adicional (Zhong, 1997; Coral *et al*., 2008; Chena *et al*., 2012) para realizar testes iniciais de fermentação e produção de AP (Figura 14). Selecionaram-se as cepas que apresentaram a maior produção de AP a partir do meio contendo o hidrolisado da casca de cacau.

FIGURA 14. MEIOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

FONTE: A autora (2017)

3.5.1. *Meio de reativação e conservação*

Reativaram-se nove cepas do gênero *Propionibacterium* (Quadro 4) proporcionadas pelo banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. Utilizou-se o meio líquido sintético de reativação proposto por Goswami e Srivastava (2000) que é composto pelos seguintes elementos: 5 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura, 40 $g \cdot L^{-1}$ de lactose, 2 $g \cdot L^{-1}$ de $(NH_4)_2PO_4$; 1 $g \cdot L^{-1}$ de KH_2PO_4, 0,01 $g \cdot L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,01 $g \cdot L^{-1}$ de $CaCl_2$, $g \cdot L^{-1}$ de $CoCl_2$, 0,005 $g \cdot L^{-1}$ de $FeSO_4$ e 0,0025 $g \cdot L^{-1}$ de $MnSO_4$.

QUADRO 4. MICRORGANISMOS DO GÊNERO *PROPIONIBACTERIUM* DO BANCO DE CEPAS DO PPGEBB, UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE AP

Código	Microrganismo
C_1	*Propionibacterium acidopropionici.* DSM *20273* /ATCC *4965*
C_2	*Propionibacterium jensenii.* DSM *20535* / ATCC *4868*
C_3	*Propionibacterium acidopropionici.* DSM *4900* / ATCC *25562*
C_4	*Propionibacterium acidopropionici.* DSM *20272* /ATCC *4875*
C_5	*Propionibacterium thoenii.* DSM *20276* / ATCC *4874*
C_6	*Propionibacterium freudenreichii* spp. *Shermanii.* DSM *4902*/ATCC *9614*
C_7	*Propionibacterium jensenii.* DSM *20274* / ATCC *4964*
C_9	*Propionibacterium freudenreichii shermanii.* NRRL *4327*
C_{11}	*Propionibacterium freudenreichii.* NRRL *3523*

FONTE: A autora (2017)

Empregaram-se tubos de ensaio de 21 mL com tampa de rosca previamente esterilizados, utilizando o volume total permitido pelo recipiente com o propósito de manter as condições de micro-aeração. Posteriormente os tubos foram incubados a uma temperatura de 33°C durante 48 h. Utilizou-se este mesmo meio para a conservação das cepas durante a realização do projeto. As cepas foram armazenadas neste meio sob refrigeração a 4ºC re-inoculando novo meio com uma frequência semanal.

3.5.2. *Meio para produção do inóculo*

Posteriormente para a produção do inóculo, repicaram-se as cepas relacionadas no Quadro 4, em tubos de ensaio de 21 mL com tampa rosca, previamente esterilizados, contendo o meio líquido proposto por Coral, (2008) e composto por 10 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura, 40 $g \cdot L^{-1}$ de lactose, 5 $g \cdot L^{-1}$ de tripticase; 1 $g \cdot L^{-1}$ de KH_2PO_4, 0,01 $g \cdot L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,01 $g \cdot L^{-1}$ de $CaCl_2$, $g \cdot L^{-1}$ de $CoCl_2$, 0,005 $g \cdot L^{-1}$ de $FeSO_4$ e 0,0025 $g \cdot L^{-1}$ de $MnSO_4$. Os tubos foram incubados a uma temperatura de 33°C durante 48 h.

3.5.3. *Meio sintético de fermentação*

Para a seleção das cepas produtoras utilizou-se o meio líquido de cultivo sintético (Tabela 3) proposto por Coral (2008), com a seguinte composição: glicerol 15 $g \cdot L^{-1}$; extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$; $(NH_4)_2HPO_4$ 2 $g \cdot L^{-1}$; KH_2PO_4 1 $g \cdot L^{-1}$; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$; 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,005 $g \cdot L^{-1}$ e $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,0025 $g \cdot L^{-1}$, distribuído em balões de fundo chato de 100 mL previamente esterilizados. A esterilização do meio realizou-se em autoclave a 121 ˚C e 1 atm., durante 15 minutos. Desenvolveu-se a fermentação em balões de fundo chato de 100 mL com tampa de borracha previamente esterilizados; com 15% (v/v) de inóculo de cada uma das cepas, incubaram-se a 33 ˚C, durante 48 h.

Para posterior análise cromatográfica, centrifugaram-se as amostras a 2300 RCF por 15 minutos em tubos tipo Falcon de 15 mL. Separou-se a fração sobrenadante, filtrou-se (através de um filtro de 0,2 μm) e armazenou-se sob refrigeração a 4ºC em *vials* de 2 mL. Determinou-se a concentração de AP produzido por cada uma das cepas testadas, mediante leitura em um Cromatógrafo HPLC *Agilent technology*, (coluna C18, 230 mm; fase móvel: ácido fórmico 0,1%; metanol 30%; vazão: 0,9 $mL \cdot min^{-1}$) baseando-se em uma curva de calibração com diferentes diluições de AP de grau analítico da Sigma-Aldrich. O tempo de retenção nesta coluna foi de 2 min 5 seg.

TABELA 3. MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA *PROPIONIBACTERIUM*

Composto	Concentração ($g \cdot L^{-1}$)
Glicerol	15,0
Extrato de levedura	10,0
$(NH_4)_2PO_4$	2,0
KH_2PO_4	1,0
$MgSO_4$	0,01
$CaCl_2$	0,01
$CoCl_2$	0,01
$MnSO_4$	0,005
$FeSO_4$	0,0025

FONTE: Coral (2008)

3.6. *Produção de ácido propiônico*

3.6.1. *Produção de ácido propiônico com o hidrolisado obtido a partir da casca de cacau*

Com as cepas produtoras de AP, previamente identificadas e selecionadas, realizou-se um teste inicial de produção do ácido, utilizando o hidrolisado obtido mediante a hidrólise química-enzimática da casca de cacau. Para tal fim, testou-se um meio de fermentação composto pelos mesmos elementos que conformam o meio sintético descrito previamente, mas ao invés de utilizar 15 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol, incluiu-se no meio 7,5 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol e hidrolisado diluído de forma a se obter 7,5 $g \cdot L^{-1}$ dos açúcares (obtido conforme item 3.4.1 e 3.4.2). O meio foi preparado com a seguinte composição: glicerol 7,5 $g \cdot L^{-1}$; concentração dos açúcares do hidrolisado 7,5 $g \cdot L^{-1}$; extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$; $(NH_4)_2HPO_4$ 2 $g \cdot L^{-1}$; KH_2PO_4 1 $g \cdot L^{-1}$; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$; 0,01 $g \cdot L^{-1}$; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,005 $g \cdot L^{-1}$ e $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,0025 $g \cdot L^{-1}$. Distribuiu-se este meio em tubos de ensaio 21 mL com tampa rosca previamente esterilizados, com 10% (v/v) de inóculo da cepa C_6 e da cepa C_7, incubados a 33°C, durante 60 h. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2300 RCF por 15 minutos em tubos tipo Falcon de 15 mL. O

sobrenadante foi passado por filtros de 0,2 μm e posteriormente analisado no HPLC *Agilent 1260 Infinity*.

3.6.1.1. Planejamento experimental Plackett & Burman: sais necessários ao meio

Para os sais necessários para a produção de AP foi realizado um planejamento experimental *Plackett & Burman* com 7 variáveis e 3 pontos centrais, resultando em 11 ensaios, e sendo a concentração de AP, a variável de resposta (Tabela 4). O meio de fermentação era composto de glicerol 7,5 $g \cdot L^{-1}$, concentração dos açúcares do hidrolisado 7,5 $g \cdot L^{-1}$ (obtido conforme item 3.4.1 e 3.4.2); extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$, em ausência ou presença dos sais $(NH_4)_2HPO_4$ (2 $g \cdot L^{-1}$), KH_2PO_4 (1 $g \cdot L^{-1}$), $MgSO_4$ (0,10 $g \cdot L^{-1}$), $CaCl_2$ (0,10 $g \cdot L^{-1}$), $CoCl_2$ (0,10 $g \cdot L^{-1}$), $FeSO_4$ (0,005 $g \cdot L^{-1}$) e $MnSO_4$ (0,0025 $g \cdot L^{-1}$). Desenvolveu-se a fermentação em tubos de ensaio 21 mL com tampa rosca previamente esterilizados, com 10% (v/v) de inóculo da cepa C_6 e da cepa C_7, incubado a 33°C, durante 60 h. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2300 RCF por 15 minutos em tubos tipo Falcon de 15 mL. O sobrenadante foi passado por filtros de 0,2 μm e posteriormente analisado no HPLC *Agilent 1260 Infinity*. Analisaram-se os resultados através do *software Statistica*® 5.0.

TABELA 4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL *PLACKETT & BURMAN* PARA DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE COMPONENTES DO MEIO SOBRE A PRODUÇÃO DE AP

Corrida	Ponto central	$(NH_4)_2PO_4$	KH_2PO_4	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$CoCl_2$	$MnSO_4$	$FeSO_4$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9 ©	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ©	0	0	0	0	0	0	0	0
11©	0	0	0	0	0	0	0	0

FONTE: A autora (2017)

3.6.1.2. Planejamento experimental DCCR: otimização das fontes de carbono e nitrogênio (C/N)

Na sequência dos experimentos, determinou-se a relação ótima carbono/nitrogênio, para o adequado desenvolvimento do microrganismo e produção do AP. Assim, mediante o *software*

Statistica® 5.0 criou-se o desenho experimental para obter a informação desejada. Empregou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR) com três variáveis e três pontos centrais, resultando em dezenove experimentos, onde a variável resposta foi a concentração de AP obtida após da fermentação. Levando em conta o conteúdo e concentrações das fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo sintético, determinaram-se as concentrações dos compostos a estudar apresentadas na Tabela 5.

Realizou-se o processo de fermentação com a cepa selecionada C_7 em tubos de ensaio de 21 mL com tampa, previamente esterilizados sob condições de incubação de 33ºC, durante 60 h e inóculo inicial de 10% (v/v). Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2300 RCF por 15 minutos em tubos tipo Falcon de 15 mL. O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,2 µm. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4ºC em *vials* de 2 mL, para serem posteriormente analisadas em HPLC *Agilent 1260 Infinity*. Analisaram-se os resultados com o *software Statistica*® 5.0.

TABELA 5. NÍVEIS ESTUDADOS DE GLUCOSE E GLICEROL PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AP

a.

Experimentos	Glucose	Glicerol	Extrato de levedura
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68179	0	0
10	1,68179	0	0
11	0	-1,68179	0
12	0	1,68179	0
13	0	0	-1,68179
14	0	0	1,68179
15 ©	0	0	0
16 ©	0	0	0
17©	0	0	0
18©	0	0	0
19©	0	0	0

b.

Composto	- 1,68	-1	0	1	1,68
Glucose	3,19	5,12	7,97	10,81	12,75
Glicerol	12,76	20,51	31,88	43,24	51,00
Extrato de levedura	3,98	6,40	9,96	13,51	15,93

3.6.1.3. Efeito da concentração das fontes de carbono, mantendo a relação C/N

Após determinar a melhor relação C/N para a produção de AP, procedeu-se na verificação de qual a melhor quantidade no meio das fontes de carbono (glicerol e hidrolisado). Partindo dos dados de literatura, determinaram-se as relações apresentadas na Tabela 6 para ser avaliadas, determinando-se como a variável de resposta, a concentração de AP e a quantidade de biomassa produzida.

TABELA 6. VARIAÇÃO DA RELAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO

Experimento		1	2	3
$g \cdot L^{-1}$	Glucose	8,0	16,0	22,0
	Glicerol	32,0	64,0	88,0
	Ext. de levedura	10,0	20,0	27,5

FONTE: A autora (2017)

A produção de AP foi realizada, em triplicata, pela cepa C_7 em tubos de ensaio de 21 mL com tampa, previamente esterilizados e posteriormente inoculado com 10% (v/v) da cepa C7, sob condições de incubação de 33ºC, durante 60 h conforme as condições apresentadas.

3.6.1.4. Determinação da melhor condição de incubação: estática ou agitada

Considerando que a cepa de *Propionibacterium jensenii* DSM 20274 (cepa C_7) é anaeróbia facultativa, testou-se o desenvolvimento do microrganismo sob condições de agitação branda e moderada, com o propósito de avaliar como esta variável de incubação poderia influenciar na produção de AP. Os tubos de ensaio de 21 mL contendo o meio sintético, previamente esterilizados foram inoculados em uma taxa de 10% (v/v). Posteriormente foram incubados durante 60 h. Para implementar a condição de agitação, utilizou-se uma incubadora com agitação orbital incorporada da *Novatecnica*, com controle de temperatura e agitação automáticas, reguladas em 33ºC e 50 e 100 rpm respectivamente. Para posterior análise cromatográfica, separou-se a fração sobrenadante, filtrou-se (através de um filtro de 0,2 μm) e armazenou-se sob refrigeração a 4ºC em *vial*s de 2 mL. As amostras foram posteriormente analisadas em HPLC *Agilent 1260 Infinity*.

3.6.1.5. Quantificação de biomassa

Quantificou-se a biomassa microbiana através do método direto de massa seco. Tubos Falcon previamente identificados e sem tampa, foram acondicionados em estufa a 80°C durante pelo menos 12 h. Completado o tempo, foram levados para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente, e registrou-se a massa determinada mediante o uso de balança analítica. 10

mL do meio fermentado foram transferidos para cada tubo (garantindo iguais massa dos tubos para posterior centrifugação) e centrifugou-se o material a 6000 RCF durante 20 min. Em seguida, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente. Empregou-se este sobrenadante para análises posteriores em HPLC e para a determinação do pH. Sobre o material remanescente no tubo Falcon, adicionaram-se 10 mL de água deionizada e homogeneizou-se o conteúdo utilizando um vortex. Na sequência, centrifugou-se de novo o material a 6000 RCF durante 20 min e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este último passo uma vez mais com o intuito de eliminar qualquer interferente. Finalizado o processo de centrifugação, secaram-se os tubos Falcon contendo a biomassa em estufa a 80°C durante pelo menos 12 h. Os tubos foram levados a um dessecador e mantidos até atingirem temperatura ambiente. Registrou-se a massa em balança analítica. O cálculo de biomassa por massa seca foi determinada conforme o indicado na Equação 14.

$$Biomassa\ (g \cdot L^{-1}) = (Massa\ tubo\ Falcon_{Final} - Massa\ tubo\ Falcon_{Inicial}) \times \left(\frac{1\ \text{L}}{0{,}01\ \text{L do meio fermentado}}\right) \quad \text{(Eq. 14)}$$

3.6.1.6. Fermentação em frasco do tipo Schott de 100 mL

Estabelecidas as melhores condições de produção do AP, procedeu-se o aumento de escala, passando de tubos de ensaio de 21 mL a frascos do tipo *Schott* de vidro de 100 mL. Para os experimentos realizados neste recipiente, tentou-se manter o mínimo de *headspace* possível para não exceder as condições de micro-aeração máximas que o microrganismo toleraria, adicionando 100 mL do meio de fermentação. Os experimentos foram realizados por duplicata. O meio de fermentação consistindo de glicerol 32 $g \cdot L^{-1}$; concentração dos açúcares do hidrolisado de casca de cacau 8 $g \cdot L^{-1}$; extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$, $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$ e $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$. Para implementar a condição de agitação, utilizou-se uma incubadora com agitação incorporada da marca *Novatecnica* com controle de temperatura e agitação automáticas, reguladas em 33ºC e 50 rpm. Os frascos do tipo *Schott*, previamente esterilizados inocularam-se em uma taxa de 10% (v/v). Durante esta etapa, acompanhou-se o desenvolvimento da fermentação com a quantificação de biomassa, medição de pH, e quantificação de compostos (açúcares, AP, produtos secundários e glicerol) através de análise em HPLC e construiu-se uma cinética de fermentação retirando em intervalos de tempos preestabelecidos, alíquotas do meio até completar 156 h de processo. Para posterior análise cromatográfica, separou-se a fração sobrenadante, filtrou-se (através de um filtro de 0,2 µm) e armazenou-se sob refrigeração a 4ºC em *vial*s de 2 mL. Analisou-se posteriormente cada amostra em HPLC *Agilent 1260 Infinity*.

3.6.1.7. Fermentação em biorreator agitado

Como etapa final, desenvolveu-se a fermentação em biorreator de marca *Inceltech LH SG1* com capacidade total de 2 L e agitação de 50 rpm. O meio de fermentação consistindo de glicerol 32 $g \cdot L^{-1}$; concentração dos açúcares do hidrolisado de casca de cacau 8 $g \cdot L^{-1}$; extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$, $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$ e $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$. A temperatura do processo foi 33ºC e uma taxa de inóculo de 10%. Acompanhou-se o desenvolvimento da fermentação com análise de quantificação de biomassa, medição de pH, e quantificação de compostos (açúcares, AP, AA, AS e glicerol) através de análise por HPLC e construiu-se uma cinética de fermentação retirando em intervalos de tempos pré-estabelecidos alíquotas do meio até completar 156 h de processo. Para posterior análise cromatográfica, separou-se a fração sobrenadante, filtrou-se (através de um filtro de 0,2 μm) e armazenou-se sob refrigeração a 4ºC em *vials* de 2 mL. Analisou-se posteriormente cada amostra no HPLC *Agilent 1260 Infinity*.

3.7. *Quantificação de compostos*

Realizou-se a quantificação dos compostos presentes tanto no hidrolisado da casca de cacau pré-tratada química e enzimáticamente (açúcares), quanto nos meios de fermentação e meios fermentados produzidos durante este trabalho (açúcares, glicerol, AP, ácido succínico (AS), ácido, acético (AA)) no equipamento HPLC *Agilent 1260 Infinity*, do laboratório de Química Analítica Avançada do PPGEBB da UFPR. As condições de processo foram: coluna Hi-Plex 300 x 7,7 mm; Fase móvel H_2SO_4 0,005 M; Isocrático; Vazão 0,6 $mL \cdot min^{-1}$; temperatura 60ºC coluna; T_{RI}: 50ºC.

3.8. *Teste de aplicação: determinação da atividade antimicrobiana do meio fermentado*

Para estabelecer e desenhar o teste atividade antimicrobiana do caldo fermentado obtido, utilizou-se como referência o Manual de provas de Susceptibilidade antimicrobiana (Cavalieri *et al.,* 2005).

Em primeiro lugar, reativaram-se as cepas refrigeradas de *Aspergillus flavus* e *Cândida albicans* utilizando o meio líquido *Sabouraud Dextrosa (*SD) seguindo as indicações do fabricante. 48 h depois, realizou-se um repique no mesmo meio para fortalecer as cepas e posteriormente, repicaram-se em meio *Sabouraud Dextrosa agar* (SDA). Transcorridas 24 h, foi preparada uma suspensão padronizada do inóculo a partir de 3-5 colônias de cada microrganismo, como é descrito a seguir. Em solução salina, suspenderam-se as colônias selecionadas com ajuda de um *swap*. Em seguida, patronizou-se a turbidez da suspensão segundo a escala de 0,5 Mc Farland (que

corresponde aproximadamente a 1,5 x 10^8 UFC·mL^{-1}). Utilizou-se suspensão nos 15 min seguintes como inóculo.

Sobre placas de Petri descartáveis (diâmetro de 9 cm) com 18 mL meio Müller-Hinton (MH) solidificado (assegurando uma profundidade de 4 mm), espalhou-se uniformemente com ajuda de uma alça de Drigalski o inóculo de cada microrganismo testado. Na sequência, e com ajuda de ponteiras descartáveis de 1 mL esterilizadas (cuja ponta foi previamente cortada a 1,5 cm) foram formados sobre o meio MH de cada placa de Petri, cinco poços para as diferentes concentrações das substancias determinadas na Tabela 7. Em cada poço depositaram-se 200 µL da substância a testar. Nos 15 minutos seguintes à preparação do inóculo (incluindo o espalhamento do inóculo na placa contendo o meio MH e elaboração dos poços), incubaram-se as placas durante 18 h a 37ºC. Transcorrido o tempo de incubação realizou-se a leitura dos resultados de cada placa, verificando-se em primeiro lugar que o crescimento tivesse sido uniforme e que não se houvesse contaminação.

TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS A ANALISAR PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CALDO DE FERMENTAÇÃO

Exp.	Concentração			
	Á. propiônico comercial (g·L^{-1})	Meio sem fermentar	Caldo fermentado	
			A. flavus	*C. albicans*
1	1	25%	25%	25%
2	2	50%	50%	50%
3	5	75%	75%	75%
4	7	100%	100%	100%
5	10	H_2O	Meio sem fermentar	Meio sem fermentar

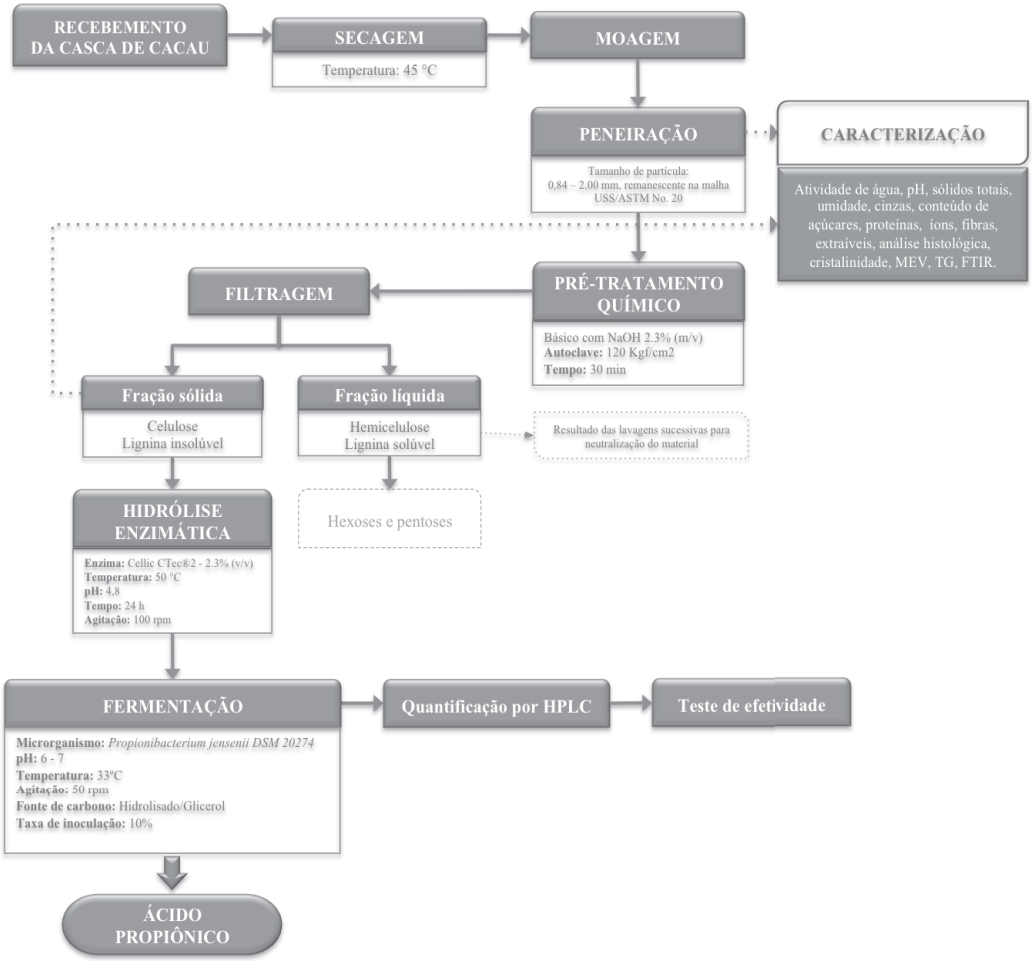
FONTE: A autora (2017)

3.9. *Análise estatística*

Utilizou-se o *software Statistica*® 5.0 para a análise dos resultados dos delineamentos experimentais. Os valores reportados em tabelas e figuras representam a média dos experimentos realizados por triplicata ou duplicata, segundo especificado em cada caso e apresenta-se o desvio padrão para cada resultado. As barras de erro representam o desvio padrão (±).

A seguir, apresenta-se o fluxograma (Figura 15) de processo seguido neste estudo, com as etapas básicas estabelecias para atingir os objetivos marcados inicialmente

FIGURA 15. FLUXOGRAMA DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE AP A PARTIR DE HIDROLISADO DA CASCA DE CACAU PRÉ-TRATADA QUÍMICA E ENZIMÁTICAMENTE



FONTE: A autora (2017)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO OBTIDO APÓS PRÉ-TRATAMENTO BÁSICO-ENZIMÁTICO E DA CASCA DO CACAU

4.1.1. *Pré-tratamento químico-enzimático de cascas de cacau*

Desenhou-se o planejamento experimental (DCCR) considerando as faixas de concentração do NaOH, as relações de massa-volume, os tempos e temperaturas de processamento reportados na literatura e apresentados previamente na revisão bibliográfica, que permitiu determinar as condições ótimas para o pré-tratamento da casca de cacau.

Os resultados da porcentagem de celulose após o pré-tratamento químico (conforme condições definidas no item 3.4.1) são apresentados na Tabela 8. A análise de resultados realizada mediante o *software Statistica*® 5.0 gerou a superfície de resposta (Figura 16) e o diagrama de Pareto (Figura 17) que permitiram analisar os resultados do experimento.

TABELA 8. RESULTADOS DCCR: DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

Experimento	Variável testada		Parâmetro de resposta
	NaOH (%)	Tempo (min)	Celulose (%)
1	1	43	19,95
2	1	107	20,49
3	3,5	43	31,71
4	3,5	107	30,98
5	0,5	75	20,01
6	4	75	28,51
7	2,3	30	26,65
8	2,3	120	28,01
9 (C)	2,3	75	27,01
10 (C)	2,3	75	26,26
11 (C)	2,3	75	27,52
12 (C)	2,3	75	28,38
13 (C)	2,3	75	26,64

FONTE: A autora (2017)

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 17), com um nível de significância de 95%, a concentração do NaOH pode ser considerada como relevante no tratamento da casca de cacau, dentre as variáveis estudadas.

FIGURA 16. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PROCESSO PARA O PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DE CACAU

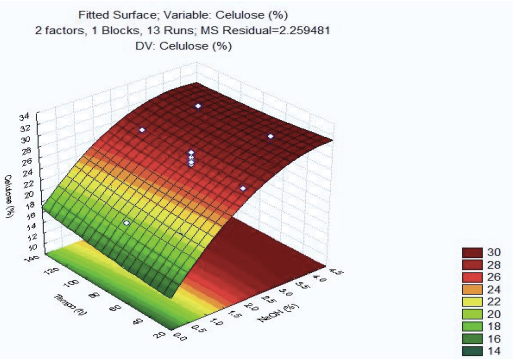
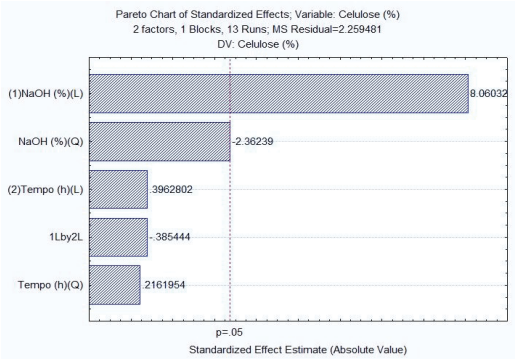


FIGURA 17. DIAGRAMA DE PARETO DO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PROCESSO PARA O PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DE CACAU



FONTE: A autora (2017)

Com os resultados apresentados na Tabela 8, e como é observado na superfície de resposta (Figura 16) a quantidade de celulose removida está diretamente relacionada com a concentração do NaOH utilizada para o pré-tratamento. Desta forma, os tratamentos com menor concentração de NaOH (0,5% - 1,0%) permitem remover uma quantidade de celulose entre 19,95% e 20,49% que estão entre as menores obtidas no experimento.

Em contrapartida, a concentração alta de NaOH (3,5%), apresenta os maiores porcentagens de remoção de celulose (até 31,7%). Quando é utilizada uma porcentagem de NaOH igual a 2,3%, a porcentagem de celulose obtida após do tratamento corresponde em média a 27,2%. Devido a que uma concentração intermediária de NaOH (2,3%) permite uma remoção semelhante de celulose comparando com altas concentrações do reagente, foi selecionada esta condição e a opção com menor tempo (considerando que não é uma variável significativa) de pré-tratamento em autoclave (30 min), afim de diminuir o consumo de energia do processo.

Durante o experimento detectou-se que as perdas de material após da hidrólise com NaOH correspondem em média a 60%. O que quer dizer que para cada grama de casca de cacau fresca que é submetida ao pré-tratamento alcalino, 0,4 gramas podem ser posteriormente tratadas enzimáticamente e o restante (0,6 g) é solubilizado no hidróxido de sódio e na águas de lavagem, para posterior descarte.

4.1.2. *Caracterização do hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento da casca de cacau*

Desde o planejamento do estudo, presumiu-se que a fração líquida obtida após do tratamento básico-enzimático fosse rica em açúcares e, por isso, poderia ser utilizada posteriormente como fonte de carbono nas fermentações para a produção da biomolécula de interesse. Após a aplicação dos pré-tratamentos, realizou-se a caracterização do hidrolisado, obtendo os resultados apresentados a seguir. Com o propósito de verificar a efetividade do processo, a composição dos íons e açúcares solúveis presentes no hidrolisado, foi comparada com a composição do extrato aquoso obtido diretamente da casca de cacau *in natura* (como foi descrito na seção 3.3).

Segundo os resultados obtidos para a quantificação de sais (Tabela 9) e comparando com os dados obtidos para o extrato aquoso, a concentração da maioria dos sais aumentou após a realização do pré-tratamento. Este fato pode ser explicado por, principalmente, duas razões: a primeira, está relacionada com a ação que o hidróxido de sódio exerce sobre a estrutura do material, uma vez que promove a quebra de ligações intermoleculares por exemplo, entre a lignina e os carboidratos (Grupta, 2008), além de promover a clivagem das ligações éster dos lipídeos do material pré-tratado, assim como o aumento do pH, que ocasiona a hidrólise e liberação de diversos elementos ligados à estrutura original, antes insolúveis. O segundo fator, estaria relacionado à composição do meio no qual encontra-se a enzima solubilizada para o pré-tratamento e de outros compostos que são solubilizados no meio após o tratamento.

TABELA 9. QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS SOLÚVEIS PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU

Íons	Concentração ($mg \cdot L^{-1}$)	
	Extrato aquoso	Hidrolisado
Ânions solúveis		
F^-	3,783	5,796
Cl^-	10,612	14,635
Br	6,594	-
NO_2^-	11,978	-
NO_3^-	-	0,309
SO_4^{-2}	21,623	1,923
PO_4^{-3}	11,171	2,853
Cátions solúveis		
NH_4^+	0,06	645,916
Na^+	0,73	-
K^+	14,66	25,363
Mg^{+2}	1,06	41,789
Ca^{+2}	1,51	64,839

FONTE: A autora (2017)

TABELA 10. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU

Açúcar (mg/g_{bs})	Sem tratamento	Básico	Básico + enzimático
Glucose	93,636	54,435	275,028
Sacarose	2,268	3,479	11,936
Xilose	43,270	19,346	18,876
Totais	**139,17**	**77,278**	**305,841**

FONTE: A autora (2017)

Em outros casos os sais solúveis que estavam presentes no extrato aquoso original não foram quantificados no hidrolisado. Isto poderia ser produto da solubilização daqueles elementos durante o processo de lavagens sucessivas após do pré-tratamento alcalino.

Com a informação obtida sobre a composição de íons do hidrolisado, foi possível determinar posteriormente se na composição do meio de fermentação seria necessária a adição de sais fundamentais para o metabolismo e crescimento do microrganismo.

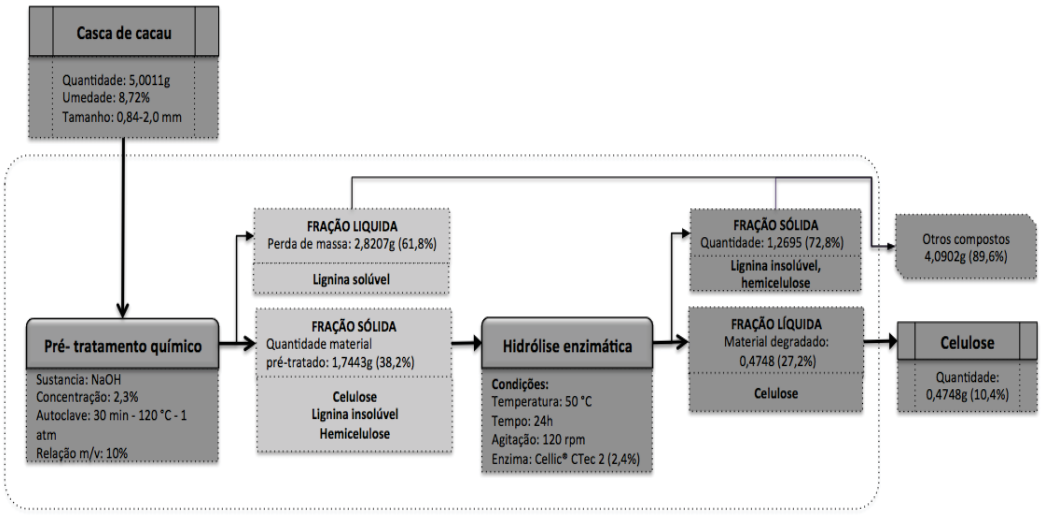
Dentre os açúcares identificados na casca de cacau, com e sem pré-tratamento, encontram-se os quantificados na Tabela 10 e foram também identificados, frutose, arabinose e celobiose em menores concentrações (dados não inclusos).

Para as amostras analisadas na Tabela 10, pode-se verificar a efetividade do pré-tratamento básico-enzimático, que para o caso da glucose, passou a apresentar uma concentração de 93,6 mg/g casca $_{(bs)}$ (partindo do extrato aquoso) até atingir uma concentração de 275,03 mg/g casca $_{(bs)}$ (análise feita a partir do hidrolisado e calculada levando em conta a quantidade de casca necessária para completar os processos de hidrólise básica e enzimática). No caso dos resultados de quantificação para a casca de cacau com pré-tratamento básico, os valores diminuíram em relação aos obtidos para a casca sem tratamento, chegando a ser 54,43 mg de glucose por grama de casca de cacau em base seca, o que obedece ao fato de uma grande quantidade dos açúcares solúveis terem sido eliminados da amostra quando tratado com o hidróxido e submetido a inúmeras lavagens com água até atingir a neutralidade da amostra e não chegam a ser tão altos quanto os determinados para a casca com o pré-tratamento enzimático devido a ser esta a função da enzima: converter a celulose presente na casca em glucose para posterior aproveitamento.

Finalmente, vale a pena considerar a presença da xilose nas amostras, que mesmo mantendo uma concentração relativamente estável ao longo dos pré-tratamentos, já para a etapa final da hidrólise enzimática não tem mudança o que ratifica que a Cellic® CTec 2 não age sobre as hemiceluloses, devido a que é um complexo enzimático conformado por endoglucanases, celobiohidrolases e ß-glucosidases, que trabalham sinergicamente para converter a celulose em açúcares mais simples, permitindo portanto a liberação só de glucose.

Apresenta-se na Figura 18, um balanço de matéria para o processo, partindo de 5 g inicias da casca de cacau *in natura*, até a obtenção do hidrolisado.

FIGURA 18. BALANÇO DE MASSA PARA O TRATAMENTO BÁSICO-ENZIMÁTICO.



FONTE: A autora (2017)

4.1.3. *Caracterização físico-química da casca de cacau pré-tratada química e enzimáticamente.*

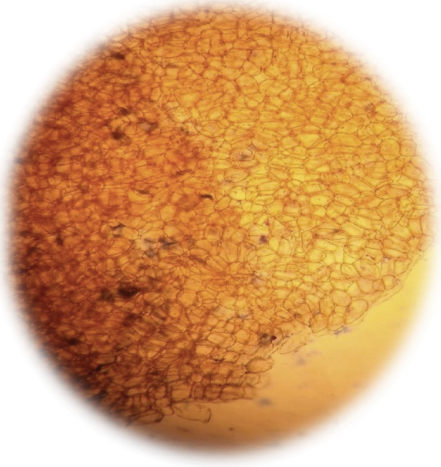
Tanto o material pré-tratado quimicamente com NaOH (em concentração de 2,3% (m/v) durante 30 min em autoclave a 120˚C) e, posteriormente, com a enzima Cellic® CTec 2, quanto a casca sem tratamento, foram caracterizados utilizando as técnicas que são descritas a seguir, com o propósito de determinar as mudanças estruturais e físico-químicas do material de interesse.

4.1.3.1. Análise histológica da casca de cacau

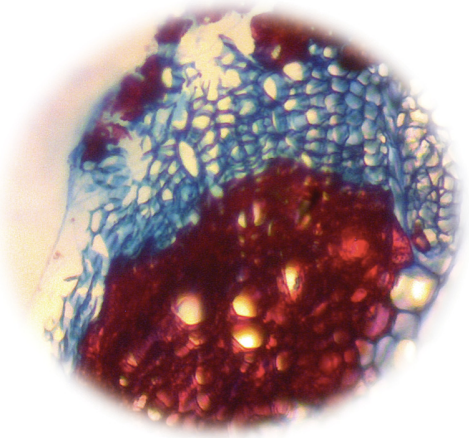
A seguir, apresenta-se a descrição das características morfológicas encontradas nas amostras de casca ou epicarpo de cacau fresca. Através de métodos de coloração e obtenção de imagens mediante microscopia ótica (MO) analisaram-se as amostras. As imagens obtidas permitiram acompanhar facilmente a descrição das estruturas e a sua relação com os tratamentos aplicados.

Na Figura 19 (a), observa-se a distribuição organizada e compacta das células da casca fresca. Na Figura 19 (b), pode-se observar o corte longitudinal de um vaso condutor tratado com safranina e azul de Astra em excesso. Para algumas amostras de casca de cacau fresca foram identificadas estruturas traqueais espiraladas (Figura 19 (c)) e estruturas traqueais com padrão de pontuação (Figura 19 (d)). Na 19 (e), pode-se observar uma única estrutura traqueal espiralada sem alteração.

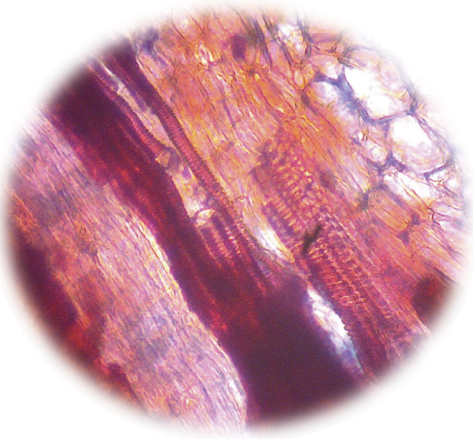
FIGURA 19. IDENTIFICAÇÃO MEDIANTE MO DAS ESTRUTURAS CELULARES PRESENTES NA CASCA DO CACAU. FONTE: A Autora (2017). ***a****. Distribuição das células vegetais (4x);* ***b.*** *Corte longitudinal de um vaso condutor (4x);* ***c****. Feixe de estruturas traqueais espiraladas (10x);* ***d.*** *Feixe de estruturas traqueais pontoadas (10x);* ***e****. Estruturas traqueal espiralada conservada(10x);* ***f.*** *) Estrutura traqueal espiralada alongada produto da ação do NaOH (10x).*



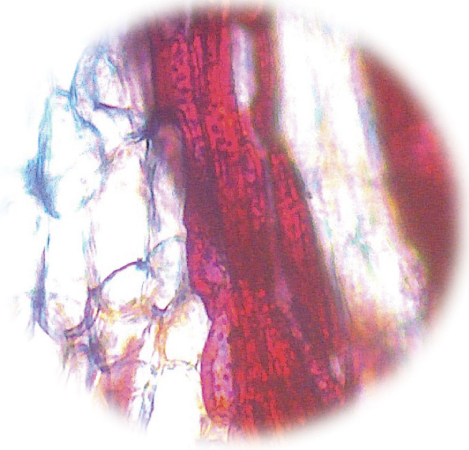
a.



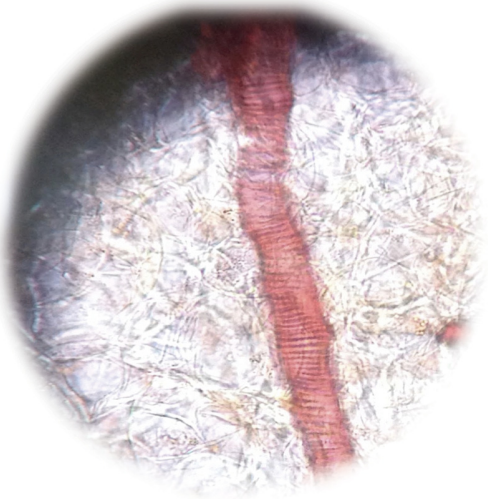
b.



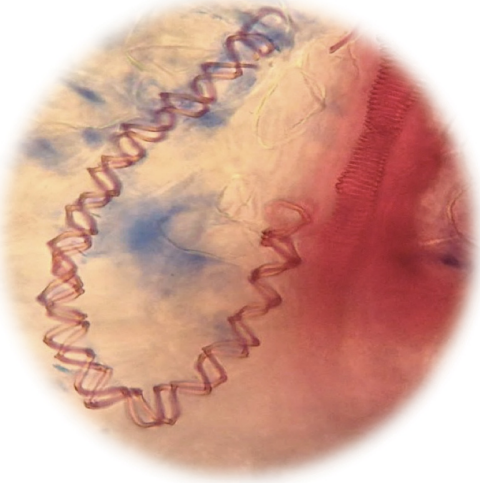
c.



d.

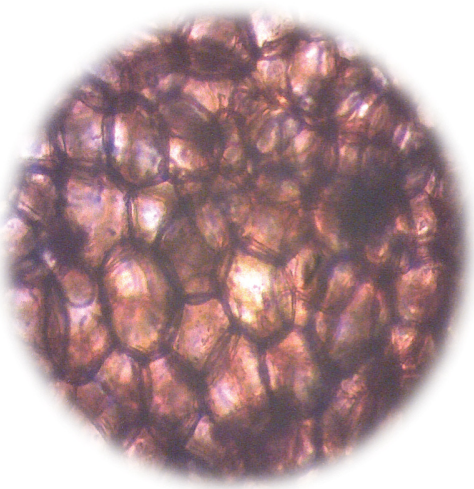


e.

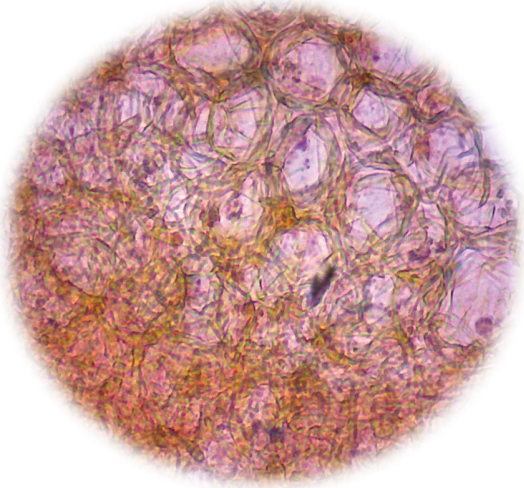


f.

FIGURA 19. CONTINUAÇÃO. IDENTIFICAÇÃO MEDIANTE MO DAS ESTRUTURAS CELULARES PRESENTES NA CASCA DO CACAU ***g.*** *Distribuição das células vegetais (10x);* ***h.*** *Distribuição das células vegetais alteradas produto da ação do NaOH (10x)*



g.



h.

É interessante observar a conformação desta estrutura e a capacidade de alongamento que possui, demonstrando sua resistência mecânica e flexibilidade para cumprir as funções dentro do tecido vegetal. Na Figura 19 (f), encontra-se esta mesma estrutura, mas desta vez alterada uma vez que foi submersa na solução de NaOH. Estas mesmas estruturas foram achadas mediante análise de microscopia eletrônica de varredura, o que permitiu verificar, mediante a aplicação das duas técnicas, maiores detalhes sobre cada uma. Tal fato propiciou a comparação do efeito que os tratamentos exercem sobre a estrutura vegetal, além de permitir abstrair as etapas pelas quais passa o material antes da obtenção do hidrolisado. A coloração permitiu diferenciar qualitativamente a distribuição da lignina e a celulose nas estruturas vegetais da casca. A safranina possibilita identificar a presença de lignina enquanto que o azul de Astra facilita o reconhecimento da celulose (Cutler *et al*., 2007). Como é explicado por Chung *et al*., (2008) a lignina presente no fruto está associada covalentemente com os polissacarídeos da parede celular e encontram-se, principalmente, nas fibras do floema e nos condutos impermeáveis do xilema. Estes são encarregados pelo transporte de água e sendo um suporte estrutural. Estes condutos estão conformados, entre outro tipo de células, pelas estruturas traqueais que podem apresentar por sua vez, conformações anelais, espiraladas, reticulada ou pontoada. Este mesmo autor determinou que este tipo de elementos traqueais encontram-se conformados por 36,1 ± 0,3% de lignina. Na Figura 19 (e - h), realizou-se a descoloração das amostras seguida com uma coloração com safranina para identificar as estruturas descritas por Chung *et al*., (2008) com maior facilidade. Na Figura 19 (g) observa-se a distribuição das células vegetais que conformam a casca do cacau tal e como recebida e na Figura 19 (h) é

possível observar o efeito que o hidróxido de sódio exerce sobre as paredes celulares expandindo estas e alterando a distribuição nativa.

4.1.3.2. Determinação da morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas para amostras sem e com pré-tratamento básico-enzimático. Na Figura 20 (a_1) é exibida a micrografia obtida mediante microscopia eletrônica de varredura em aumento de 50x, da casca de cacau após da ruptura mecânica feita com moinho de rotor de facas.

FIGURA 20. MICROGRAFIA POR MEV DAS AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU

a_1. Casca sem tratamento (50x); **a_2.** Casca sem tratamento (1.000x); **a_3.** Casca sem tratamento (2.000x); **b_1.** Casca pré-tratada alcalinamente (50x).

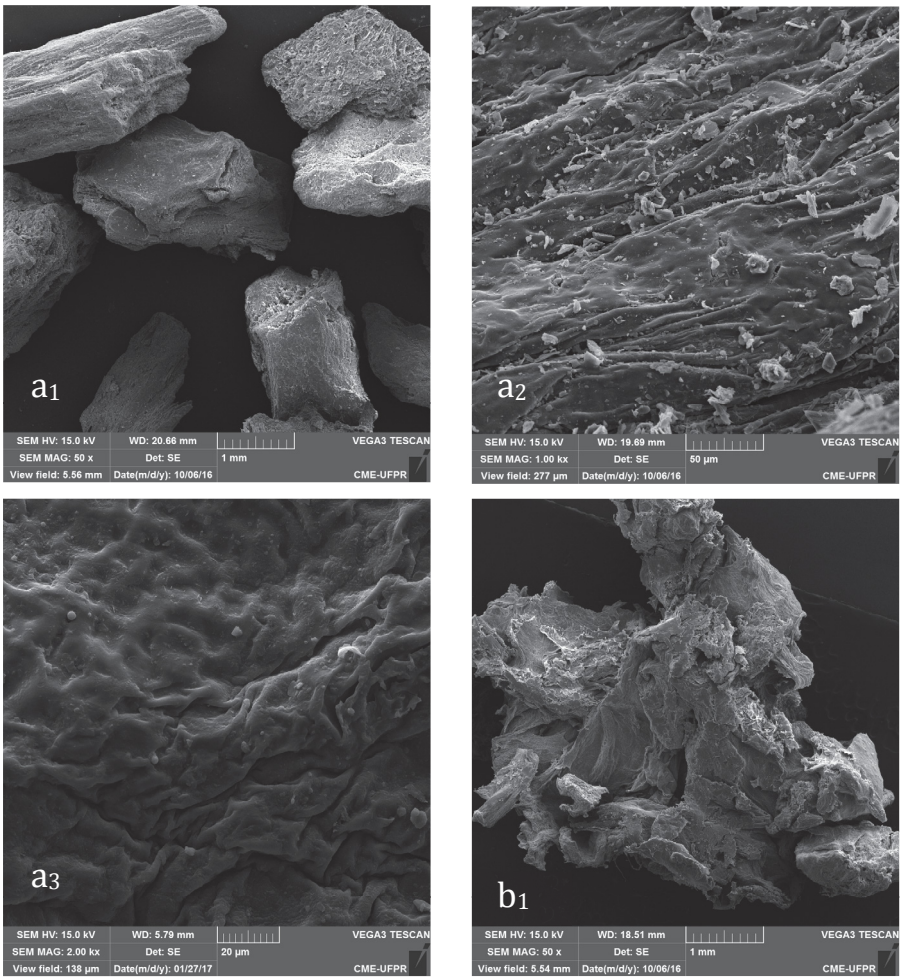
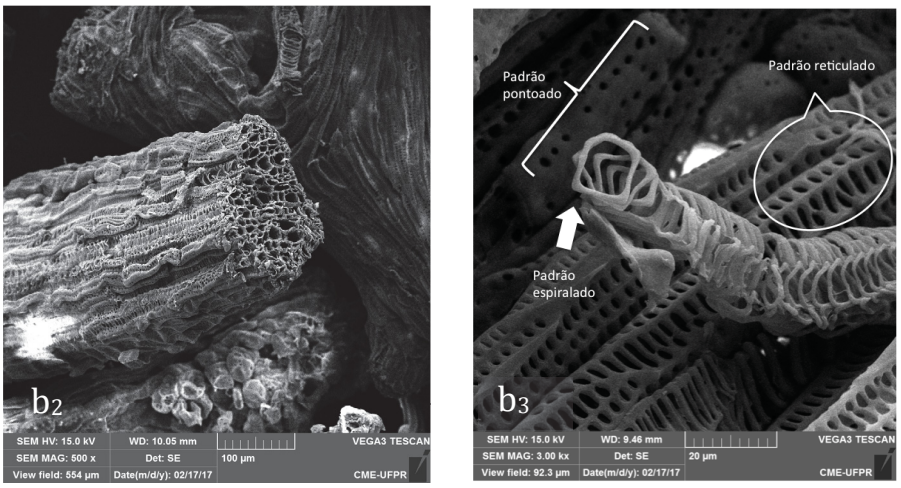


FIGURA 20. CONTINUAÇÃO. MICROGRAFIA POR MEV DAS AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU. b_2. Casca com pré-tratamento básico-enzimático (500x); **b_3.** Casca com pré-tratamento básico-enzimático (3.000x).



FONTE: A autora (2017)

Observam-se fragmentos irregulares, com aspecto fibroso e poroso. A observação deste mesmo material em um aumento de 1000x (Figura 20 (a_2)), apresenta uma superfície externa compacta e rugosa com presença de alguns grânulos de material particulado resultante do processo de moagem. Já com um aumento de 2000x identifica-se sobre a superfície externa e rugosa da casca de cacau *in natura*, o depósito de ceras epicuticulares do fruto (Figura 20 (a_3)).

Os resultados das micrografias permitem verificar como o pré-tratamento altera a estrutura superficial e interna da casca de cacau. Com o pré-tratamento alcalino e posterior tratamento enzimático, a porosidade superficial das partículas da casca de cacau aumenta com relação ao material original (Figura 20 (b_1)). Na Figura 20 (b_2) apresenta-se a visão longitudinal do material pré-tratado química e enzimáticamente, na qual é possível observar claramente um feixe vascular exposto devido à ação do pré-tratamento. Na visão longitudinal apresentada na Figura 20 (b_3) observa-se o tecido vascular da casca de cacau, apresentando configuração pontoada e reticulada, próprias de elementos traqueais do metaxilema e da mesma forma, observa-se uma conformação estrutural espiralada própria dos elementos traqueais do protoxilema, descrita também no trabalho de Chung *et al*., (2008) para a casca do cacau.

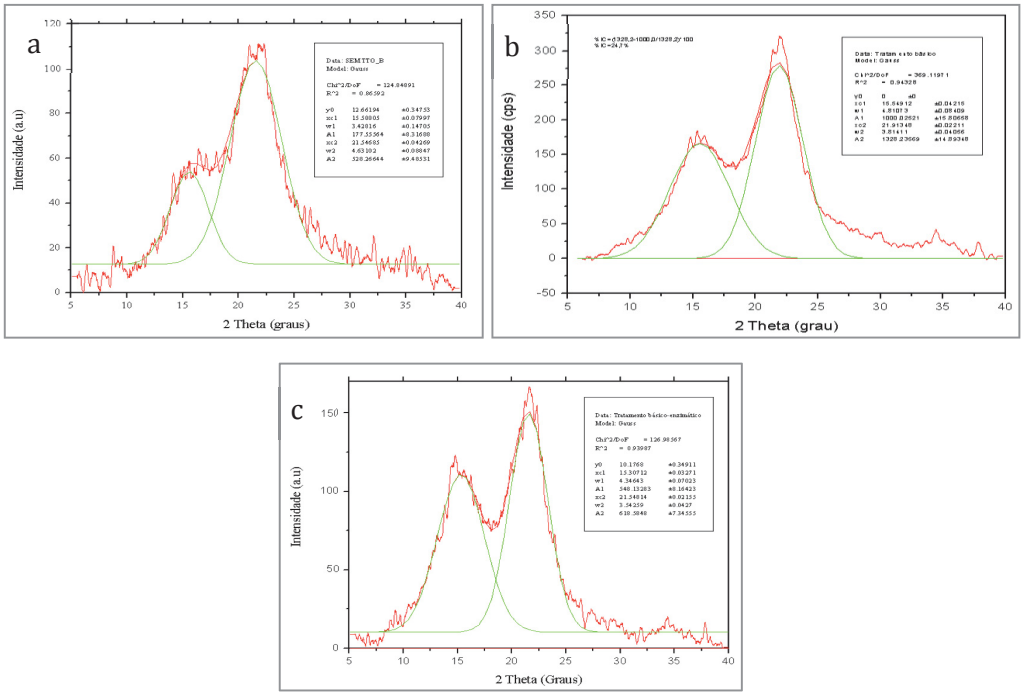
4.1.3.3. Determinação do grau de cristalinidade por difração de raios X

A principal aplicação desta técnica é a identificação de compostos cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos. O índice de cristalinidade indica a quantidade de celulose que se encontra

em estado cristalino, e em consequência a celulose em estado amorfo. Este índice é um dos fatores importantes para se determinar as propriedades mecânicas dos materiais lignocelulósicos. Para o presente estudo, esta análise permitiu relacionar o nível de efetividade do tratamento com NaOH sobre o material e a disponibilidade da fração de celulose amorfa à qual as enzimas teriam acesso para realizar a respectiva hidrólise.

A Figura 21 mostra o difratograma das amostras de casca de cacau. O índice de cristalinidade calculado mediante a Equação 13, para a amostra de casca de cacau sem tratamento é 65%, enquanto que para a amostra de casca com pré- tratamento básico o índice é igual a 28% e para a amostra com tratamento básico enzimático este índice é de 11%.

FIGURA 21. DIFRATOGRAMAS DRX DE AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU.
(a) Casca de cacau sem tratamento; (b) Casca de cacau com tratamento básico; (c) Casca de cacau com tratamento básico-enzimático



FONTE: A autora (2017)

No estudo publicado por Maryana *et al*., (2014) no qual foi realizado o tratamento com NaOH em bagaço de caca de açúcar, o índice de cristalinidade também apresentou uma queda após o pré-tratamento. Acredita-se que a redução do índice de cristalinidade, uma vez aplicado o pré-tratamento, é devido ao efeito que exerce o NaOH na estrutura lignocelulósica, a qual interage e ocasiona a alteração dos enlaces da lignina, concordando com os resultados expostos por Alvira *et al.,* (2010). Uma vez modificada a lignina do material, que é a que fornece a rigidez e principal proteção para este tipo de material, a hemicelulose e a celulose se tornam expostas e vulneráveis à

ação do reagente alcalino, porém o efeito dele sobre estas estruturas é menos drástico. Maryana *et al*., (2014) postula que os danos sofridos pela cadeia de celulose como resultado do pré-tratamento, têm como consequência uma série de rearranjos que alteram a estrutura cristalina da mesma, tornando-a amorfa e por este motivo o índice de cristalinidade diminui.

Desta forma, os resultados obtidos mediante a análise de difração por raio X para a determinação do índice de cristalinidade da casca de cacau com tratamento básico e básico-enzimático, permitiram verificar a efetividade dos mesmos. Em primeiro lugar, a casca pré-tratada alcalinamente encontra-se corretamente condicionada para o posterior tratamento enzimático, pois a fração amorfa da celulose aumentou consideravelmente, e de acordo com o argumentado por inúmeros estudos atuais sobre o tema (e entre eles, o publicado por Park *et al.*, 2012), este fato permite que a digestibilidade enzimática aumente, possibilitando a recuperação de uma maior quantidade de açúcares presentes na biomassa. Em segundo lugar, e já com a celulose exposta e degradada, a enzima agiu sobre esta, clivando diversos tipos de ligações do polímero, para liberar a glucose, aumentando ainda mais os domínios amorfos da amostra, e em consequência, diminuindo o índice de cristalinidade.

4.1.3.4. Determinação de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Com o propósito de verificar mudanças químicas ocorridas na casca de cacau após realizar o pré-tratamento alcalino e o tratamento básico-enzimático, efetuou-se a análise de espectroscopia comparada com a amostra sem tratamento. Esta técnica permite obter facilmente, informações diretas sobre os grupos funcionais que integram o material estudado. Os resultados para a casca de cacau sem tratamento e submetida a pré-tratamentos, são apresentados na Figura 22.

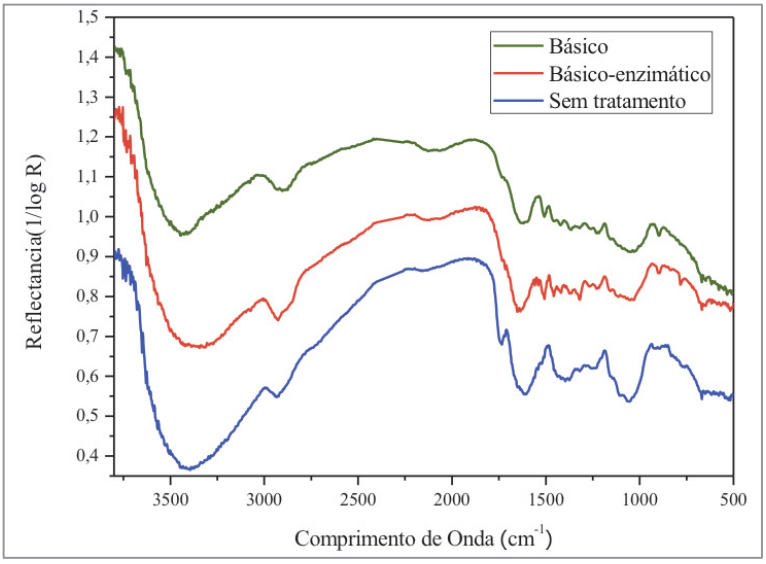
Os espectros obtidos para as três amostras permite evidenciar a complexidade da composição da biomassa estudada, pois é identificada uma gama de grupos funcionais que comumente constituem o material lignocelulósico, como por exemplo, C-H, C-O, C=O, O-H, C-O-C. Utilizando como referência as tabelas de análise de espectros FTIR reportadas por Silverstein *et al.,* (2005), descreve-se a seguir os resultados obtidos para as amostras observadas.

Na Figura 22 (a), na região entre 3600 até 3000 cm^{-1} (atribuídas à vibração de estiramento grupos OH), na amostra sem tratar (linha azul), a banda é larga e intensa. Nas amostras com pré-tratamento, apresentaram-se alterações que atuaram diretamente nestes grupos fazendo que a

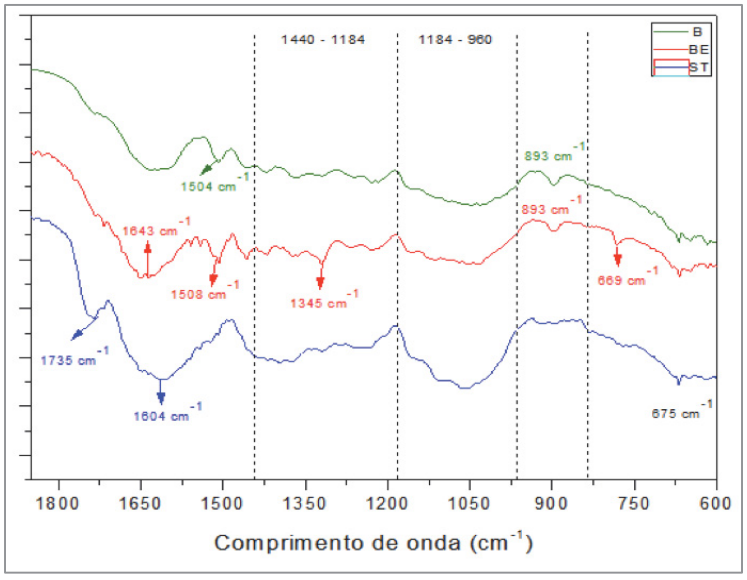
intensidade desta região diminuísse consideravelmente. Na região entre 2925–2885 cm^{-1} é possível verificar a presença de duas bandas pouco intensas e estreitas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H dos grupos CH_3, CH_2 e CH, conforme também observado por Tinwala *et al* (2015).

FIGURA 22. ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE CACAU.
(a)Espectroscopia por infravermelho entre 3800-500 cm-1, das amostras de casca de cacau sem e com pré-tratamento. (b) – Espectro de FTIR das amostras de casca de cacau entre 1850-600 cm^{-1}

a.



b.



FONTE: A autora (2017)

A região entre 1800 e 900 cm^{-1} é conhecida como a "impressão digital" e aqui é possível identificar as diferenças mais importantes entre as amostras e com o proposito melhorar a análise

dos resultados, esta região foi ampliada (Figura 22 (b)). Primeiramente na região de 1735 cm^{-1} é observada, para a amostra sem tratar (linha azul) uma banda estreita e de média intensidade, e na mesma região para as outras amostras, esta banda é sutil. As alterações nesta região são atribuídas ao grupo carbonila não conjugado das hemiceluloses (Xu *et al*., 2013). Na região compreendida entre 1700 e 1500 cm^{-1} (atribuída aos grupos C=O e C=C) é possível verificar que a amostra sem tratamento existe uma banda larga e intensa quando comparada com as amostras com tratamento; ocorre ainda outro fenômeno: na amostra pré-tratada alcalinamente (linha verde) não há definição de ligações específicas, embora existam sutis picos para o tratamento básico-enzimático (linha vermelha) e na amostra sem tratar. A amostra com pré-tratamento básico apresenta um pico em 1504 cm^{-1} e a amostra com pré-tratamento básico enzimático em 1508 cm^{-1}, que pode ser atribuído as vibrações C=C de anéis aromáticos presentes na lignina. Na região de 1440-1184 cm^{-1} aparecem alterações originadas com os pré-tratamentos, e atribuídas à deformação dos grupos C-H, O-H de celuloses, hemiceluloses e ligninas. Para a amostra com pré-tratamento básico na região de 1215 cm^{-1} aparece uma banda característica do estiramento das ligações C-C e C-O da lignina. Na região de 1184 a 960 cm^{-1} a banda é muito mais larga para a amostra sem tratar quando comparada com as amostras com pré-tratamento, o que corresponderia ao estiramento assimétrico das ligações C-O-C de celuloses e hemiceluloses. Para as amostras com pré-tratamentos, na região de 893 cm^{-1} aparece uma banda definida e com intensidade média, que corresponde à alteração das ligações glicosídicas. Finalmente na região de 675 cm^{-1} para as três amostras, é evidenciada a vibração de torção de =C-H.

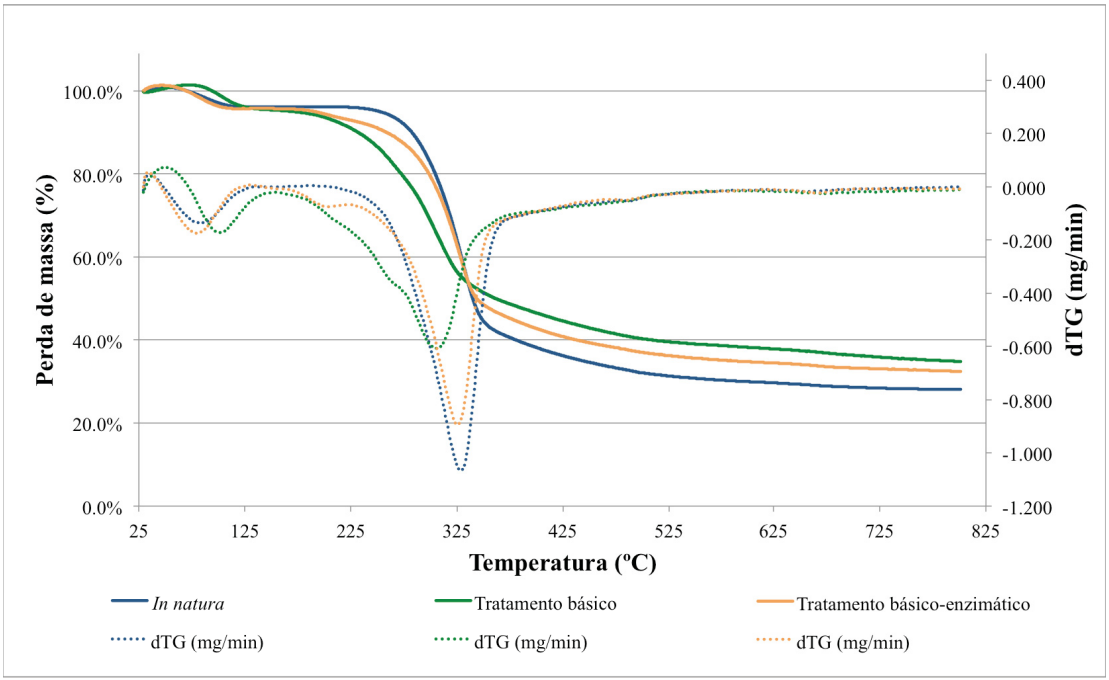
Em resumo, comparando os espectros obtidos é possível ratificar o efeito dos pré-tratamentos sobre a casca de cacau, pois as bandas que inicialmente apareciam no material sem tratar foram alteradas, o que significa que ocorreram novas ligações e rompimento de enlaces originais. Segundo a literatura, o pré-tratamento alcalino age sobre as estruturas conformadas por lignina e polissacarídeos presente no material lignocelulósico (Garima *et al*., 2014) o que para este estudo é de grande importância pois a diminuição da recalcitrância do material, gerada em grandes quantidades pelo conteúdo de lignina, facilita posteriormente a acessibilidade da enzima aos compostos celulósicos.

4.1.3.5. Determinação das propriedades térmicas mediante análises termogravimétricas (TG/dTg)

A termogravimetria, segundo o explicado por Earnest (1988), é uma técnica na qual, a variação da massa de uma substância é continuamente monitorada em função da temperatura (ou tempo) mediante o controle da atmosfera e da temperatura. Esta técnica é rápida, precisa e

reprodutível para a determinação das temperaturas e as taxas de reação derivadas das mudanças da massa do material analisado. Nas curvas termogravimétricas (ou simplesmente curvas TG) resultantes da análise, observa-se o perfil de decomposição térmica do material em diferentes etapas e encontra-se diretamente relacionada com compostos específicos, que para o caso da biomassa vegetal, estariam classificados como hemicelulose, celulose e lignina. Na Figura 23 são apresentadas as curvas TG obtidas para as amostras de casca de cacau *in natura* (linha azul), para a casca de cacau pré-tratada com NaOH (linha verde) e para a casca de cacau com pré-tratamento básico enzimático (linha laranja) e suas respectivas derivadas (dTG).

FIGURA 23. CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU SEM E COM PRÉ-TRATAMENTO BÁSICO



FONTE: A autora (2017)

Na Figura 23, para cada curva TG das amostras de casca de cacau é possível identificar três eventos térmicos, característicos de material lignocelulósico. No caso do termograma da casca *in natura* (linha azul), o primeiro evento térmico (Zona 1) de degradação da amostra, pode ser observado entre 29ºC e 125ºC. Nesta faixa, ocorre perda de massa relacionada com a evaporação dos compostos voláteis de baixa massa molar e da água adsorvida. Na região compreendida entre 125ºC e 500°C encontra-se o segundo e mais importante evento térmico (Zona 2), onde é gerada a degradação ou despolimerização dos compostos de hemicelulose, celulose e lignina e que corresponde com a maior perda de massa (Chen *et al.,* 2015). Para esta amostra a porcentagem de

variação de massa corresponde aproximadamente a 64%. Perto de 500°C e até 800°C, o material é transformado em cinzas. Durante este último evento térmico (Zona 3) é possível localizar a degradação total do material, resultando em óxidos ou cinzas dos elementos inorgânicos que constituem o material. O material residual para esta amostra corresponde a 28,1%.

Na curva TG da amostra de casca de cacau com pré-tratamento básico (linha verde), observa-se que o processo de degradação, possui os três mesmos eventos térmicos. O primeiro deles (Zona 1) apresenta-se na região entre 34°C – 152°C onde é possível determinar a perda de voláteis (água adsorvida, água absorvida e voláteis de baixa massa molar). A segunda região (Zona 2) compreendida entre 152°C e 500°C corresponde à degradação ou despolimerização das frações lignocelulósicas com uma perda aproximada de massa de 54%. Finalmente (Zona 3) a degradação total do material tem lugar entre 500ºC e 800ºC, onde a amostra é transformada em material inorgânico e com uma porcentagem residual de 34,9.

A curva TG obtida para a amostra de casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático (linha laranja), apresenta o primeiro evento térmico (Zona 1) entre 20°C – 120ºC onde é identificada a perda de compostos voláteis. A segunda região (Zona 2) compreendida entre 120ºC e 500°C corresponde à degradação ou despolimerização das frações lignocelulósicas com uma perda aproximada de massa de 59%. Finalmente, entre 500ºC e 800ºC observa-se a degradação total do material (Zona 3) onde a amostra é transformada em material inorgânico correspondente a 32,5% do material inicial de análise.

Como foi identificado em cada curva TG e segundo a informação exposta no Quadro 5, a maior perda de massa corresponde a amostra sem pré-tratamento.

QUADRO 5. TEMPERATURAS DE DEGRADAÇÃO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU.

Amostra de casca de cacau	Temperaturas de degradação (ºC)			
	Zona I	Zona II	Zona III	Perda de massa (%)
In natura	29 – 125	125 – 500	500 – 800	71,9
Tratamento básico	34 – 152	152 – 500	500 – 800	65,1
Tratamento básico-enzimático	20 - 120	120 - 500	500 - 800	67,5

FONTE: A autora (2017)

Comparando esta amostra com o material pré-tratado e como esperado, a perda de massa é maior, pois parte do material foi previamente retirado com os processos químicos e biológicos respetivamente efetuados sobre o material analisado. Na Figura 21 também é possível identificar

através de cada um das derivadas geradas (linhas descontínuas) para as amostras com pré-tratamento, alterações durante o processo de degradação. No caso do pré-tratamento alcalino com NaOH (linha descontínua verde), observa-se a surgimento de um "ombro" entre as temperaturas 260°C - 270ºC o que se supõe, poderia corresponder a degradação de material residual depositado na amostra de casca e relacionado com o hidróxido de sódio. No caso da amostra da casca com pré-tratamento básico-enzimático entre 200°C e 250ºC este mesmo "ombro" é observado e possivelmente poderia associar-se com a presença de resíduos dos compostos da formulação enzimática utilizada para o pré-tratamento.

O resultado desta análise permite concluir que a estabilidade térmica das amostras de casca de cacau é afetada pelos tratamentos tanto básico como básico-enzimático quando comparados com a casca de cacau *in natura*.

4.1.3.6. Determinação de parâmetros físico-químicos

Os resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos: pH, atividade de água (a_w), umidade, cinzas, quantificação de açúcares, íons e proteínas obtidos para a casca de cacau *in natura* foram realizados logo após a chegada da matéria prima. Estes estão apresentados na Tabela 11. O extrato aquoso da casca de cacau apresentou um pH de 6,18 e a casca de cacau uma atividade de água após a secagem igual a 0,283 ± 0,004, o que permite armazenar o material em condições herméticas, sem correr o risco de crescimento de microrganismos. Os sólidos totais da casca, quantificados em 96,79 ± 0,3 e a umidade determinada em 3,21 ± 0,3, correspondem, por uma parte à quantidade de sólidos remanescentes após aquecimento da amostra a 105ºC até massa constante. Por outra parte, o teor de umidade é uma medida da quantidade de água (e outros componentes volatilizados a 105ºC) presente na amostra de casca de cacau. As cinzas correspondem ao material inorgânico (principalmente minerais) residual contido na amostra após incineração a 575ºC.

TABELA 11. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS PARA A CASCA DE CACAU SEM TRATAMENTO

Parâmetros	
pH	6,18 ± 0,01
Atividade de água (a_w)	0,283 ± 0,004
Sólidos totais (%)	96,79 ± 0,3
Umidade (%)	3,21 ± 0,3
Cinzas (%)	10,98 ± 0,25
Açúcares totais (mg/g_{bs})	129,5 ± 0,015
Proteínas solúveis (mg/g_{bs})	5,15 ± 0,05

FONTE: A autora (2017)

Nas referências disponíveis na Tabela 1, o conteúdo de cinzas encontram-se numa faixa entre 6,7 e 13,5% e para este estudo o teor de cinzas foi de 10,98 ± 0,25 %. Os açúcares totais aqui apresentados foram quantificados pelo método de DNS e correspondem a um valor de 12,95 ± 0,55 ($g/100g_{bs}$). Vriesmann *et al.*, 2011 por sua vez reportou os dados de açúcares redutores presentes na casca de cacau com um valor de 10,4 ± 0,7 ($g/100g_{bs}$), enquanto que para este trabalho corresponderam a 4,62 ± 0,005 ($g/100g_{bs}$). As proteínas quantificadas neste estudo correspondem a 5,15 ± 0,05 $g/100g_{(bs)}$, valor que está próximo aos valores reportados na literatura que estão na faixa de 4 -10 g proteína/$100g_{(bs)}$.

4.1.3.7. Determinação de carboidratos estruturais e lignina

Na Tabela 12, são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de lignina e carboidratos estruturais presentes na casca de cacau antes e depois do pré-tratamento. Em geral, após do tratamento básico, a presença de compostos como lignina, extraíveis e resíduos ácido insolúveis, diminuíram consideravelmente. Este resultado é coerente, considerando que para a obtenção do material, após da moagem, a casca (fração sólida) inicialmente deve ser tratada com NaOH e posteriormente passar por sucessivas lavagens. Em cada uma destas etapas, o material passa por modificações estruturais e alterações na composição, o que é refletido nos resultados aqui obtidos.

TABELA 12. RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DE LIGNINA E CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE CASCA DE CACAU ANALISADAS

Componentes	% g/g (base seca)	
	In natura	Tratamento básico
Extraíveis (%)	**27,86**	**2,43**
Água	23,29	1,34
Etanol	3,05	0,92
Éter	1,52	0,17
Umidade (%)	**3,21**	**3,17**
Proteínas como recebida **(%)**	**7,92**	**7,25**
Cinzas como recebida **(%)**	**9,68**	**9,48**
Lignina como recebida **(%)**	**26,19**	**21,17**
Lignina ácido-solúvel - ASL (%)	3,40	2,86
Lignina ácido-insolúvel - AIL (%)	32,91	18,83
Lignina livre de extraíveis (%)	36,30	21,70
Carboidratos estruturais (%)	**16,25**	**45,55**
Glucanos	13,65	31,78
Xylanos	0,60	11,88
Celobiose	2,00	1,89
Outros compostos* (%)	**8,89**	**10,95**
Total (%)	**100**	**100**

FONTE: A autora (2017)

A prévia quantificação de lignina e segundo a norma NREL/TP-510-42618, a biomassa deve ser condicionada retirando os compostos extraíveis. Segundo a norma NREL/TP-510-42619 os extraíveis podem ser definidos como "*...o material presente na biomassa que é solúvel em água ou etanol durante a extração exaustiva. Os extraíveis incluem componentes não-estruturais da biomassa que poderiam interferir em análises posteriores*".

A quantificação deste material foi realizada utilizando os solventes éter, etanol e água. Determinou-se importante empregar estes solventes, pois cada um deles consegue retirar compostos de diferente natureza. O éter de petróleo permite retirar compostos não polares como os óleos vegetais; o etanol solubiliza material como clorofila, ceras, taninos ou outros componentes menores e a água permite remover material inorgânico, açúcares não estruturais, material nitrogenado entre outros compostos. Da casca de cacau *in natura* foi extraído um total de 27,86% de compostos extraíveis, enquanto que da casca submetida ao pré-tratamento básico foi extraído só 2,43%, o que, como já foi explicado, era de se esperar, pois os compostos inicialmente contidos na casca sem tratar, foram progressivamente retirados em cada uma das etapas do tratamento aplicado.

A efetividade do processo é demonstrada com uma variação de 19% entre o material original e o material pré-tratado, passando de 26,2% para 21,2% respectivamente. A redução da presença de lignina após do tratamento é atribuída à ação do hidróxido de sódio sob as condições estabelecidas, que permitiram mediante o processo de saponificação, como é relatado na literatura, a ruptura de ligações intermoleculares de tipo éster que se encontram articulando a lignina e parte da hemicelulose (Chiaramonti *et al*., 2012). As referências bibliográficas reportadas na Tabela 1 têm reportado faixas entre 14 e 26% no conteúdo de lignina para a casca de cacau, portanto o resultado obtido concordaria com estudos prévios, mas não tendo referências previas sobre a efetividade do pré-tratamento básico efetuado sobre este material, a redução de 19% do conteúdo de lignina, seria um dado inicial à espera de ser verificado em estudos posteriores.

A análise de carboidratos estruturais das amostras permitiu identificar glucose, xilose e celobiose (este último açúcar é um indicador de hidrólise incompleta) mediante a leitura no HPLC. Para a casca sem tratar a porcentagem de carboidratos estruturais foi de 16,25% enquanto que foi quantificado 45,5% para casca de cacau após o pré-tratamento, e segundo os açúcares identificados, foi a glucose que contribuiu em maior medida a este importante incremento (Tabela 10). Este fato ratifica a efetividade do tratamento básico, pois cumpriu-se o propósito de reduzir o conteúdo de lignina e aumentar a porosidade do material para a posterior ação da lignina.

O resumo da análise composicional da casca de cacau tratada alcalinamente e *in natura* apresentada na Tabela 12, incluiu outros itens, que correspondem à fração de compostos que não foram quantificados neste estudo. Análises como a determinação da porcentagem de acetato, de

acetil, de ácido levulínico, de ácidos urónicos e hexaurônicos não foram efetuadas. Recomenda-se para futuros estudos, incluir a quantificação de outros compostos que permitam conhecer essa porcentagem de forma desagregada.

4.2. CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO A PARTIR DO HIDROLISADO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E ENZIMÁTICO DA CASCA DE CACAU

4.2.1. *Escolha do microrganismo para produção de ácido propiônico*

Do banco de cepas do PPGEBB foram selecionadas as cepas de *Propionibacterium*, avaliando-se as nove disponíveis e utilizando um meio de reativação e, posteriormente um meio para a preparação do pré-inóculo e um meio de fermentação sintético, tal e como foi descrito na seção 3.6. O critério de seleção dos microrganismos foi a produção de AP. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

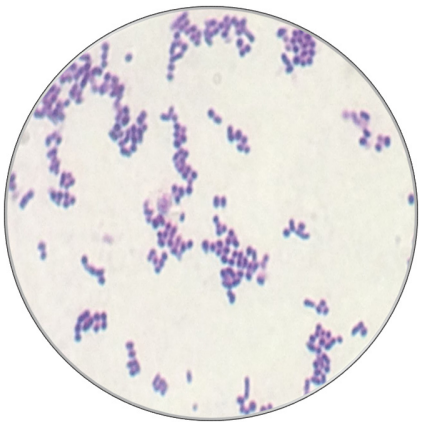
TABELA 13. *SCREENING* DAS CEPAS DE *PROPIONIBACTERIUM* PARA PRODUÇÃO DE AP

Código	Microrganismo	Produção de AP	Concentração ($g \cdot L^{-1}$)
C_1	*Propionibacterium acidopropionici* DSM *20273* /ATCC *4965*	✗	-
C_2	*Propionibacterium jensenii* DSM *20535* / ATCC *4868*	✗	-
C_3	*Propionibacterium acidopropionici* DSM *4900* / ATCC *25562*	✗	-
C_4	*Propionibacterium acidopropionici* DSM *20272* /ATCC *4875*	✗	-
C_5	*Propionibacterium thoenii* DSM *20276* / ATCC *4874*	✗	-
C_6	*Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* DSM *4902* / ATCC *9614*	✓	3,82
C_7	*Propionibacterium jensenii* DSM *20274* / ATCC *4964*	✓	4,99
C_9	*Propionibacterium freudenreichii shermanii* NRRL *4327*	✗	-
C_{11}	*Propionibacterium freudenreichii* NRRL *3523*	✗	-

FONTE: A autora (2017)

Entre as nove cepas ensaiadas, só duas delas conseguiram adaptar-se e produzir AP. Desta forma, nas etapas posteriores foram utilizadas as cepas pertencentes as espécies *P. freudenreichii* spp. *shermanii* ATCC 9614 (C_6) e *P. jensenii* DSM 20274 / ATCC 4964 (C_7) as quais produziram 3,82 e 4,99 $g \cdot L^{-1}$ de AP respectivamente após de 48 h de incubação em meio sintético (Tabela 14). Depois de desenvolver diferentes processos de fermentação com as duas cepas selecionadas inicialmente, a cepa *P. jensenii* DSM 20274 / ATCC 4964 (C_7) apresentou sempre as produções de AP com maiores concentrações no meio e menor geração de subprodutos como ácido succínico (AS), ácido acético (AA) e maior consumo de glicerol. Por este motivo, decidiu-se continuar o estudo com a cepa de *P. jensenii* DSM 20274 / ATCC 4964 (C_7) (Figura 24).

FIGURA 24. COLORAÇÃO DE GRAM PARA *PROPIONIBACTERIUM JENSENII* DSM 20274 (C_7). OBJETIVA DE IMERSÃO (1.000x).



FONTE: A autora (2017)

Inicialmente, utilizando a cepa selecionada, foi desenvolvida uma prova simples de fermentação do extrato aquoso da casca de cacau. Com o propósito de verificar se o microrganismo era capaz de produzir AP a partir do extrato, foi adicionado glicerol 7,5 $g \cdot L^{-1}$ e extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$ e foi inoculado em uma taxa de 10% (v/v) e incubado durante 48 h. A análise efetuada sobre o caldo após do tempo de incubação, demostrou que a produção de AP foi de 0,88 $g \cdot L^{-1}$. Assim, foi comprovado que o extrato aquoso da casca de cacau por si só, não é um meio adequado para o desenvolvimento e produção de AP. Acredita-se que uma das características do extrato aquoso que poderia ter dificultado o desenvolvimento do microrganismo, é a importante viscosidade observada que este possui, atribuída a presença de pectina.

4.2.2. *Otimização da produção de ácido propiônico em meio com hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento básico enzimático da casca de cacau*

Uma vez reativadas e identificadas as cepas capazes de produzir AP em meio sintético, procedeu-se à utilização do hidrolisado de casca de cacau como parte do meio de fermentação. Em primeiro lugar, estabeleceu-se um planejamento experimental do tipo *Plackett & Burman* para a definição dos compostos necessários para produção de AP. Em segundo lugar, foi otimizada a relação carbono/nitrogênio do meio de fermentação, para definir qual seria a melhor proporção das fontes de carbono, pois utilizou-se glicerol além dos açúcares presentes no hidrolisado obtido a partir da casca do cacau.

4.2.2.1. Planejamento experimental Plackett & Burman (P&B): sais necessários ao meio

Baseando-se nos resultados apresentados por P. Harada (2012), que definiu que os sais do meio de pré-inóculo não possuíam influência significativa na produção de biomassa para as mesmas nove cepas de *Propionibacterium* avaliadas neste projeto, decidiu-se realizar um experimento para verificar estes resultados, mas desta vez investigaram-se o meio de pré-inóculo e o meio de fermentação com o hidrolisado de casca de cacau. Sendo assim, foi inicialmente mensurada a adaptação da cepa C_7. Em seguida, delineou-se um experimento P&B com 7 variáveis (correspondentes aos sais) e 3 pontos centrais, resultando em 11 ensaios (Tabela 14), por meio do qual foi possível verificar o efeito de cada componente individualmente sobre a produção de AP pela cepa C_7.

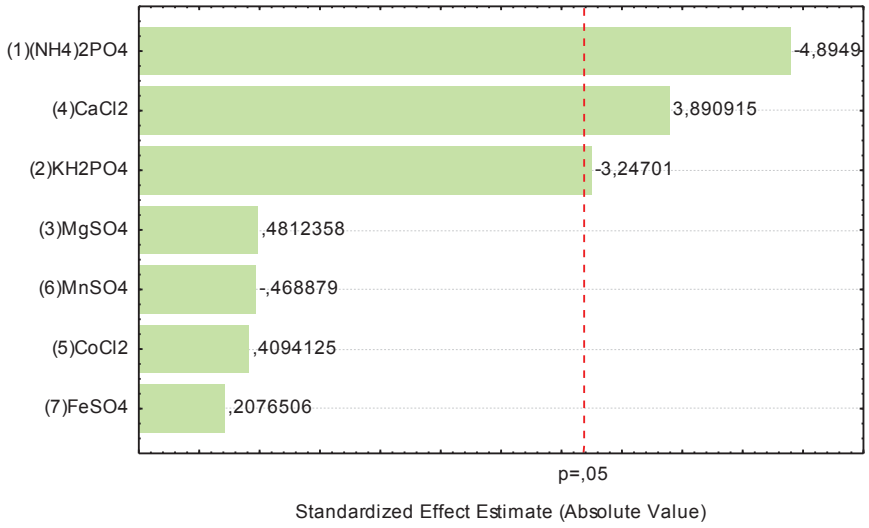
TABELA 14. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS - INFLUÊNCIA DE COMPONENTES ADICIONADOS AO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE AP

Exp.	Ponto central	$(NH_4)_2PO_4$	KH_2PO_4	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$CoCl_2$	$MnSO_4$	$FeSO_4$	AP ($g \cdot L^{-1}$)
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	6,29
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,96
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	4,62
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	4,20
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	6,48
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	4,26
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	4,46
8	1	1	1	1	1	1	1	1	4,36
9 ©	0	0	0	0	0	0	0	0	4,35
10 ©	0	0	0	0	0	0	0	0	4,39
11©	0	0	0	0	0	0	0	0	4,46

FONTE: A autora (2017)

Os resultados do efeito dos componentes avaliados sobre a produção de AP estão expostos na Figura 23. Com estes resultados e segundo a análise de variância, concluiu-se que os sais empregados para a produção de AP $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 e $CaCl_2$ possuem significância estatística (p=0,05). Por um lado, os sais $(NH_4)_2HPO_4$ e KH_2PO_4, apresentaram uma influência negativa sobre a produção sob as condições testadas, pois o valor negativo do efeito estimado ultrapassou a linha de significância (p=0,05). Por outro lado, com um nível de significância de 95% a adição do sal $CaCl_2$ resultou ser importante para a produção de AP.

FIGURA 25. DIAGRAMA DE PARETO–INFLUÊNCIA DE COMPONENTES ADICIONADOS AO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE AP



FONTE: A autora (2017)

Considerando que o meio de fermentação estava conformado, entre os outros compostos, pelo hidrolisado da casca de cacau pré-tratada, o resultado mostrando que é recomendável reduzir a adição do sal $(NH_4)_2HPO_4$ é coerente com os dados obtidos na caracterização realizada para o hidrolisado. Como foi apresentado na Tabela 9, o conteúdo do íon NH_4^+ no hidrolisado é equivalente a 0,65 $g \cdot L^{-1}$, que comparado com a composição do meio, no qual são adicionadas 2 $g \cdot L^{-1}$ deste sal no meio permite concluir que o hidrolisado por si só, já está suprindo as necessidades mínimas do microrganismo para este sal. Este mesmo fato ocorre com o sal KH_2PO_4, pois o hidrolisado já contém o cátion K^+ em uma concentração de 0,025 $g \cdot L^{-1}$, e o ânion de PO^{-3}_4 em uma concentração de 0,03 $g \cdot L^{-1}$ o que explica o fato da adição destes compostos não ser necessária.

Como resultado, o meio que foi utilizado para os próximos estudos teve a seguinte composição: glicerol 7,5 $g \cdot L^{-1}$; glucose (do hidrolisado de casca de cacau) 7,5 $g \cdot L^{-1}$ (obtido conforme item 3.4.1 e 3.4.2); extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$ e o sal $CaCl_2$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$.

4.2.2.2. Planejamento experimental DCCR: otimização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio (relação C/N)

Na sequência, foram determinadas as concentrações ótimas das fontes de carbono, glicerol e glucose (proveniente do hidrolisado), e a concentração da fonte de nitrogênio (que para este caso é o extrato de levedura), com o propósito de proporcionar os nutrientes adequados para o melhor desempenho da cepa C_7 durante a produção do AP. Assim, implementou-se o delineamento composto central rotacional-DCCR 2^3 com três variáveis e três pontos centrais, resultando em dezenove experimentos, onde a variável resposta foi a concentração de AP obtida após da

fermentação (Tabela 5 (a)). Considerando o conteúdo e concentrações das fontes de carbono e nitrogênio para o meio de cultivo sintético (Tabela 3 na seção de 3.5.3), determinaram-se as concentrações de glicerol, de hidrolisado e de extrato de levedura para este experimento, e que foram apresentadas na seção de materiais e métodos (Tabela 5 (b.)).

Os resultados do planejamento experimental DCCR sobre o estudo da influência das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, são apresentados na Tabela 15 e representados no diagrama de Pareto (Figura 26 (a.)) e na superfície de resposta gerados (Figura 26 (b.)). Para este experimento foi realizado um controle de fermentação com o meio composto por glicerol 7,5 $g \cdot L^{-1}$; glucose (do hidrolisado de casca de cacau) 7,5 $g \cdot L^{-1}$, extrato de levedura 10 $g \cdot L^{-1}$ e o sal $CaCl_2$ 0,01 $g \cdot L^{-1}$, com uma concentração de AP igual a 1,90 $g \cdot L^{-1}$.

TABELA 15. RESULTADOS DCCR PARA A OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

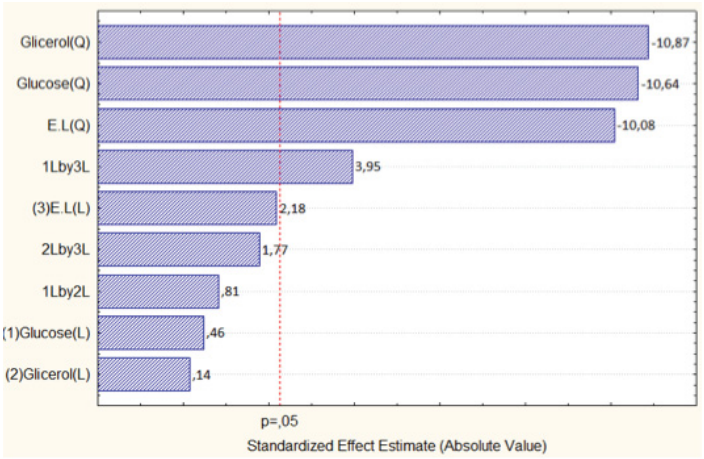
Desenho experimental				Concentrações ($g \cdot L^{-1}$)			Resultados AP ($g \cdot L^{-1}$)
Exp.	Glucose	Glicerol	Ext. levedura	Glucose	Glicerol	Ext. Levedura	
1	-1	-1	-1	5,1	20,5	6,4	1,27
2	-1	-1	1	5,1	20,5	13,5	0,74
3	-1	1	-1	5,1	43,2	6,4	0,89
4	-1	1	1	5,1	43,2	13,5	0,91
5	1	-1	-1	10,8	20,5	6,4	0,70
6	1	-1	1	10,8	20,5	13,5	1,15
7	1	1	-1	10,8	43,2	6,4	0,68
8	1	1	1	10,8	43,2	13,5	1,28
9	-1,68	0	0	3,2	31,9	10,0	0,86
10	1,68	0	0	12,8	31,9	10,0	0,97
11	0	-1,68	0	8,0	12,8	10,0	0,84
12	0	1,68	0	8,0	51,0	10,0	0,94
13	0	0	-1,68	8,0	31,9	4,0	0,81
14	0	0	1,68	8,0	31,9	15,9	1,14
15 ©	0	0	0	8,0	31,9	10,0	2,15
16 ©	0	0	0	8,0	31,9	10,0	1,86
17©	0	0	0	8,0	31,9	10,0	2,08
18©	0	0	0	8,0	31,9	10,0	2,19
19©	0	0	0	8,0	31,9	10,0	2,30

FONTE: A autora (2017)

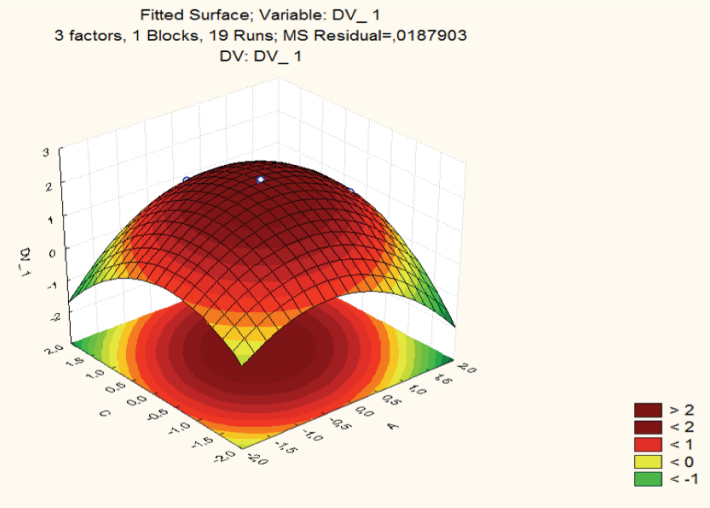
As maiores concentrações de AP alcançadas (entre 1,86 $g \cdot L^{-1}$ e 2,30 $g \cdot L^{-1}$) foram obtidas para os pontos centrais do planejamento experimental, que correspondem a uma concentração de 8 $g \cdot L^{-1}$ de glucose proveniente do hidrolisado da casca de cacau, 32 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol e 10 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura. Para os pontos centrais a relação C/N é de 4:1. Outros estudos já têm utilizado esta relação C/N usando glicerol ou glucose, junto com extrato de levedura (Dishisha *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2015). Por outro lado, a menor concentração de AP (0,68 $g \cdot L^{-1}$) apresentou-se para uma relação C/N 8:1. O estudo que até agora, reporta a maior relação C/N foi elaborado por Liu *et al*., 2012 e correspondeu a 5:1.

FIGURA 26. DCCR – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO. *a. Diagrama de Pareto – Efeitos das concentrações de fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de AP; b. Superfície de Resposta – DCCR – Estudo da influência das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio (Glucose x Extrato de levedura).*

a.



b.



FONTE: A autora (2017)

No diagrama de Pareto é possível verificar que com um nível de significância de 95% as três variáveis estudadas possuem um efeito sobre a produção de AP, devido a que diminuem a concentração do produto quando são incrementadas as concentrações dos compostos avaliados, e quando usada a menor concentração dos compostos favoreceu-se o aumento da produção da biomolécula. Mediante o diagrama de Pareto, também é possível verificar que a única interação entre as variáveis que é significativa, é a concentração de glucose e a concentração de extrato de levedura, ocasionando um efeito positivo sobre a produção de AP. Com estes resultados, a próxima

etapa de experimentos foi a definição da melhor concentração da glucose (proveniente do hidrolisado) e do glicerol, mantendo-se a relação C/N identificada nesta etapa.

4.2.2.3. Efeito da concentração das fontes de carbono

Uma vez conhecida que a relação C/N ótima para a produção de AP é de 1:4, procedeu-se verificar se incrementando a quantidade de carbono presente no meio (mantendo a relação C/N de 4:1), a produção de AP conseguia ser incrementada na mesma proporção. Desta forma, para o total das fontes de carbono adicionadas no meio analisaram-se as concentrações de 40 $g \cdot L^{-1}$, 80 $g \cdot L^{-1}$ e 110 $g \cdot L^{-1}$. Seguindo a metodologia proposta na seção 3.6.1.4, obtiveram-se os dados apresentados na Tabela 16.

TABELA 16. RESULTADOS DA VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO

Experimento		1	2	3
$g \cdot L^{-1}$	Glucose	8,0	16,0	22,0
	Glicerol	32,0	64,0	88,0
	Ext. de levedura	10,0	20,0	27,5
Resultados				
	pH	4,34 ± 0,01	4,75 ± 0,05	4,91 ± 0,04
$g \cdot L^{-1}$	**Biomassa**	1,53 ± 0,2	1,61 ± 0,04	1,29 ± 0,2
Quantificação de compostos produzidos				
$g \cdot L^{-1}$	Á. succínico	0,35 ± 0,01	0,83 ± 0,57	0,45 ± 0,02
	Á. acético	0,18 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,10
	Á. propiônico	4,20 ± 0,07	2,12 ± 0,04	1,34 ± 0,25
% de consumo de fontes de carbono				
%	Glucose	18,14 ± 0,01	1,40 ± 0,02	5,39 ± 0,03
	Glicerol	23,60 ± 0,004	16,41 ± 0,02	17,69 ± 0,03
Rendimento de produtos em substrato				
(g/g)	Á. succínico	0,02	0,02	0,02
	Á. acético	0,06	0,08	0,03
	Á. propiônico	0,47	0,20	0,08

FONTE: A autora (2017)

A análise dos resultados permite determinar que em resumo, a melhor condição é a nomeada como Experimento 1 (Tabela 16) para a produção de AP. Nesta condição é utilizada uma concentração de 8 $g \cdot L^{-1}$ da glucose proveniente do hidrolisado da casca de cacau e uma concentração de 32 $g \cdot L^{-1}$ para o glicerol. A concentração de AP obtida com estas concentrações, foi de 4,20 ± 0,07 $g \cdot L^{-1}$ e um rendimento de 0,47 g AP/g de substrato. O rendimento aqui obtido,

encontra-se próximo do reportado como teóricos por Parizzi *et al*., (2012) com 55% de rendimento quando produzido a partir de glucose exclusivamente, o que pode ser considerado como um parâmetro guia para este trabalho. A concentração e rendimentos de AP para os experimentos 2 e 3 são a metade em relação com a obtida no experimento 1, nos quais a produção foi de 2,12 ± 0,04 $g \cdot L^{-1}$ (rendimento de 0,20 g AP/g de FC) e 1,34 ± 0,25 $g \cdot L^{-1}$ (rendimento de 0,08 g AP/g de FC) respectivamente. Este fato pode ser atribuído às elevadas concentrações de compostos no meio (identificada a partir de 80 $g \cdot L^{-1}$ da fonte de carbono e 20 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura) o que poderia ter ocasionado uma certa repressão ou intolerância do microrganismo nesta condição.

Com relação à variação do pH no meio de fermentação, o Experimento 1 apresentou menor pH final com um valor de 4,34 ± 0,01 e a biomassa final atingiu um total de 1,53 ± 0,2 $g \cdot L^{-1}$ que para o caso, não é a maior concentração de todos os experimentos, como sim o é para o experimento 2 com um total de 1,61 ± 0,04 $g \cdot L^{-1}$ de biomassa.

Analisando o consumo da origem da FC, é no experimento 1 onde o consumo de glucose proveniente do hidrolisado é a maior com 18,14 ± 0,01% e um consumo de glicerol igual a 23,60 ± 0,004% que comparado com os experimentos 2 e 3 resulta ser a maior.

No que se refere a geração de subprodutos, os experimentos 2 e 3 apresentam as maiores concentrações tanto para o AS (0,83 ± 0,57 $g \cdot L^{-1}$ e 0,45 ± 0,02 $g \cdot L^{-1}$ respectivamente) quanto para o AA (0,24 ± 0,04 $g \cdot L^{-1}$ e 0,27 ± 0,10 $g \cdot L^{-1}$ respectivamente) em comparação com o experimento 1 que gerou 0,35 ± 0,01 $g \cdot L^{-1}$ de AS e 0,18 ± 0,04 $g \cdot L^{-1}$ de AA. Verificando assim, que quando a concentração das fontes de carbono aumenta, em consequência a concentração dos subprodutos, também aumenta como é possível verificar nos experimentos 2 e 3 (Tabela 16).

Com os resultados aqui apresentados e tendo como principais critérios de seleção, a quantidade de AP produzido e o rendimento obtido, além da porcentagem de glucose (proveniente do hidrolisado de cacau) consumida, o Experimento 1 é o que forneceu os melhores resultados e para tanto foram estas as condições com as quais foram planejados os experimentos posteriores.

Conhecendo que o consumo de glicerol no experimento apresentado na Tabela 16, foi no máximo de 23,6% efetuou-se um experimento adicional com o propósito de determinar se modificando a relação das fontes de carbono, que para o experimento anterior correspondeu a uma relação 1:4 (1 $g \cdot L^{-1}$ de glucose para cada 4 $g \cdot L^{-1}$ de glicerol), conseguia-se simultaneamente incrementar o consumo do microrganismo destes substratos, sem afetar a produção de AP. Assim, foi avaliada a relação 1:3 para as fontes de carbono, mantendo a relação C/N de 1:4, previamente estabelecida. Os resultados desta prova encontram-se na Tabela 17.

TABELA 17. PRODUÇÃO DE AP UTILIZANDO UMA RELAÇÃO DE FONTES DE CARBONO DE 1:3 (GLUCOSE: GLICEROL)

Experimento		
$g \cdot L^{-1}$	Glucose	10,0
	Glicerol	30,0
	Ext. de levedura	10,0
Resultados		
	pH	4,44 ± 0,03
$g \cdot L^{-1}$	**Biomassa**	1,65 ± 0,1
Quantificação de compostos produzidos		
$g \cdot L^{-1}$	Á. succínico	0,34 ± 0,01
	Á. acético	0,19 ± 0,01
	Á. propiônico	4,09 ± 0,13
% de consumo de fontes de carbono		
%	Glucose	7,69 ± 0,08
	Glicerol	28,85 ± 0,07
Rendimento de produtos em substrato		
(g/g)	Á. succínico	0,09
	Á. acético	0,04
	Á. propiônico	0,43

FONTE: A autora (2017)

Neste caso, a produção de AP foi de 4,09 ± 0,13 $g \cdot L^{-1}$ com um rendimento de 0,43 g AP/ g de substrato. Comparativamente, o resultado do experimento anterior, a concentração foi igual a 4,20 ± 0,07 $g \cdot L^{-1}$ de AP com um rendimento de 0,47 g AP/ g de substrato, pelo que a geração do produto se mantem relativamente constante. Enquanto ao consumo das fontes de carbono, a utilização do glicerol por parte do microrganismo passou a ser 28,85%, quando previamente tinha atingido um total de 23,6% pelo que é evidente que a redução da relação das fontes de carbono contribui com o maior consumo de glicerol. Não obstante, é importante ver que o consumo da glucose foi reduzido de forma importante passando de 18,14 ± 0,01% no experimento anterior, para 7,69 ± 0,08% quando usada uma relação menor das fontes de carbono. Devido a que o principal fim é o aproveitamento da glucose proveniente do hidrolisado para a obter as melhores produções de AP, para os próximos experimentos decidiu-se manter a relação 1:4 para as fontes de carbono glucose e glicerol no meio de fermentação.

4.2.2.4. Determinação da melhor condição de incubação: estática ou agitada

Aproveitando a características da cepa *Propionibacterium jensenii* DSM 20274 (C_7) de ser anaeróbia facultativa, avaliou-se o desenvolvimento do microrganismo sob condições de agitação branda (50 rpm) e moderada (100 rpm), com o propósito de avaliar a influência desta variável sobre a produção de AP. Após o período de incubação ainda em tubo de 21 mL e utilizando meio

sintético, nas condições relatadas na seção 3.6.1.3. obtiveram-se os resultados de produção de AP, biomassa e subprodutos apresentados na Tabela 18.

TABELA 18. COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO SOBRE PRODUÇÃO DE AP EM MEIO SINTÉTICO E TUBOS DE 21 ML

Parâmetros		100 rpm	50 rpm
Á. propiônico	$g \cdot L^{-1}$	2,87 ± 0,04	4,10 ± 0,07
Biomassa		0,51 ± 0,13	0,24 ± 0,1
Rendimentos			
Á. Propiônico	(g de AP /g de substrato)	0,61 ± 0,03	0,64 ± 0,04
Á. Succínico	(g de AS /g de substrato)	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Á. Acético	(g de AA /g de substrato)	0,52 ± 0,11	0,07 ± 0,01

FONTE: A autora (2017)

Ocorreu um aumento de 30% na concentração de AP (passando de 2,87 ± 0,04 $g \cdot L^{-1}$ para 4,1087 ± 0,07 $g \cdot L^{-1}$) quando aplicada agitação de 50 rpm. Considera-se que a condição de agitação branda, propicia uma melhor homogeneização e suspenção celular com a melhoria das transferências de massa, sem promover a aeração, além de levar a menores concentrações dos subprodutos, comparado com a condição com agitação de 100 rpm. Porém, a biomassa nesta condição (0,24 ± 0,1 $g \cdot L^{-1}$) apresentou uma queda significativa, sendo que em 100 rpm a produção de biomassa foi de 0,51 ± 0,13 $g \cdot L^{-1}$ o que pode estar relacionado com a preferência metabólica pelo desenvolvimento de biomassa. Contudo, o rendimento não se viu afetado negativamente na condição com 50 rpm, o que permitiu empregar esta condição em próximas etapas de fermentação em volumes maiores, com o propósito de evitar a acumulação ou sedimentação de material durante o processo.

4.2.2.5. Fermentação em frasco do tipo Schott *de vidro de 100 mL*

Em seguida considerou-se o aumento de escala para o processo de fermentação passando de frascos de 21 mL de capacidade para frascos do tipo *Schott* de vidro de 100 mL. Esta etapa foi desenvolvida com agitação branda (50 rpm), e as demais condições já citadas na seção 3.6.1.3. Desta vez, foi utilizado o hidrolisado obtido da casca de cacau pré-tratada química e enzimáticamente. Os resultados são apresentados na Tabela 19. Tanto a concentração quanto o rendimento de AP em substrato apresentaram melhores resultados quando realizada a fermentação em frascos *Schott* de vidro de 100 mL obtendo uma concentração final de 5,06 ± 0,6 $g \cdot L^{-1}$ comparados com 4,20 ± 0,07 $g \cdot L^{-1}$ obtidos no tubo de 21 mL (aumento de 17%). Com um volume maior o rendimento de AP melhorou, e as concentrações de subprodutos não aumentaram significativamente, como é desejado neste tipo de fermentação.

TABELA 19. COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ESCALA NA PRODUÇÃO DE AP COM MEIO COM HIDROLISADO DE CASCA DE CACAU E 50 RPM

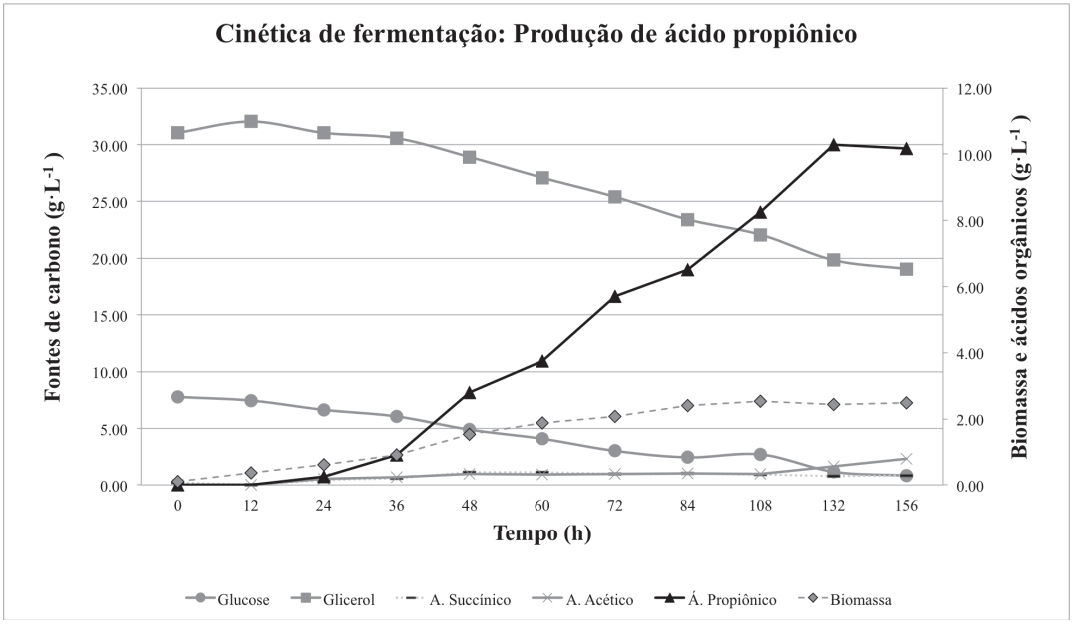
Parâmetros		21 mL	100 mL
Á. propiônico	$g \cdot L^{-1}$	4,20 ± 0,07	5,06 ± 0,6
Biomassa		1,53 ± 0,2	1,65 ± 0,09
Rendimentos			
Á. Propiônico	(g de AP /g de substrato)	0,47 ± 0,02	0,56 ± 0,07
Á. Succínico	(g de AS /g de substrato)	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,001
Á. Acético	(g de AA /g de substrato)	0,02 ± 0,03	0,03 ± 0,01

FONTE: A autora (2017)

É importante destacar que, quando o volume de fermentação aumentou (de 21 mL para 100 mL), o consumo de glucose aumentou 60% enquanto que, o consumo de glicerol diminuiu 38%.

Posteriormente, e uma vez conhecidas as melhores condições de processo, uma cinética de produção de AP foi conduzida durante 156 h sob as condições apresentadas na seção 3.6.1.6. A cinética de fermentação encontra-se representada na Figura 27.

FIGURA 27. CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE AP, REALIZADA POR *P. jensenii* DSM 20274 EM MEIO CONTENDO HIDROLISADO DE CASCA DE CACAU E GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO REALIZADA EM FRASCOS DO TIPO *SCHOTT* DE 100 ML.



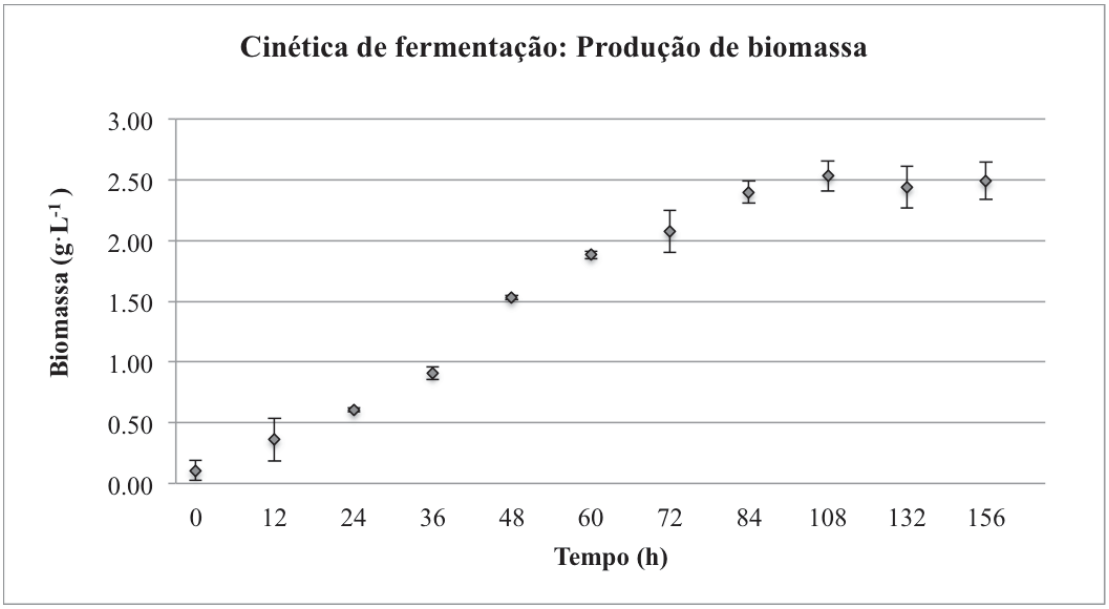
FONTE: A autora (2017)

Após de 156 h de processo, a concentração de AP no meio atingiu um máximo de 10,28 $g \cdot L^{-1}$ e a melhor produtividade foi de 0,079 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ após 72 horas. O melhor rendimento em

substrato foi de 0,59 g AP/g de substrato após de 108 h de processo. Nesse momento, atingiu-se a maior concentração de AS com 0,68 $g \cdot L^{-1}$, enquanto que a maior concentração de AA (0,8 $g \cdot L^{-1}$) foi registrada após de 156 h de processo. Coral, (2008) utilizando esta mesma cepa, conseguiu uma produtividade máxima de 0,064 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ e uma concentração de AP igual a 8,98 $g \cdot L^{-1}$ utilizando como fonte de carbono glicerol e melaço de cana. Liu *et al*., (2016) atingiram concentrações de 26,95 de AP depois de 228 h de processo, também com uma cepa de *P. jensenii* (ATCC 4868) com fermentação em batelada alimentada, utilizando como única fonte de carbono glicerol. Zhuge *et al*., (2015), conseguiram uma concentração de 21,38 $g \cdot L^{-1}$ de AP, após 156 h de processo, utilizando a cepa *P. jensenii* proporcionando glicerol como fonte de carbono. Mesmo que as diferenças sejam significativas, convém ressaltar que as concentrações de AP obtidas nesta etapa de estudo ainda não foram otimizadas, possibilitando melhorias neste respeito.

Durante esta fermentação, um dos parâmetros acompanhados foi o pH. Com um pH inicial de 6,45 do meio e um pH final de 3,96 considera-se que a evolução deste parâmetro junto com os que serão apresentados a seguir, está dentro do esperado. O seguinte parâmetro acompanhado foi a produção de biomassa e é exibida na Figura 28. Nesta curva de crescimento do microrganismos *P. jensenii* DSM 20274 é possível diferenciar com clareza as etapas de desenvolvimento do microrganismo durante a fermentação, onde a etapa de adaptação é rápida, e seguida pela etapa de crescimento exponencial, atingindo seu máximo após 72 h, para logo alcançar o estado estacionário.

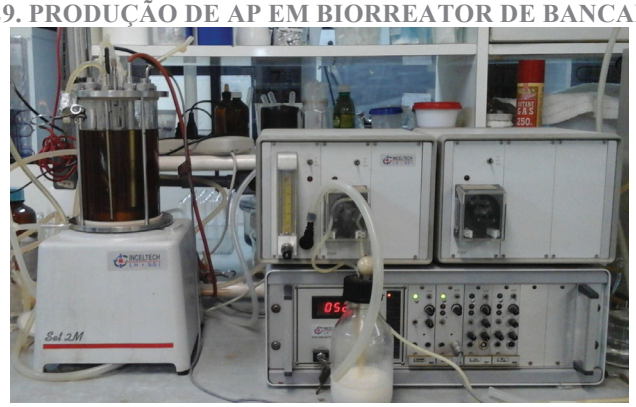
FIGURA 28. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *P. JENSENII* DSM 20274 EM MEIO CONTENDO HIDROLISADO DE CASCA DE CACAU E GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO REALIZADA EM FRASCOS DO TIPO *SCHOTT* DE VIDRO DE 100 ML.



FONTE: A autora (2017)

4.2.2.6. Fermentação em biorreator agitado de 2 L

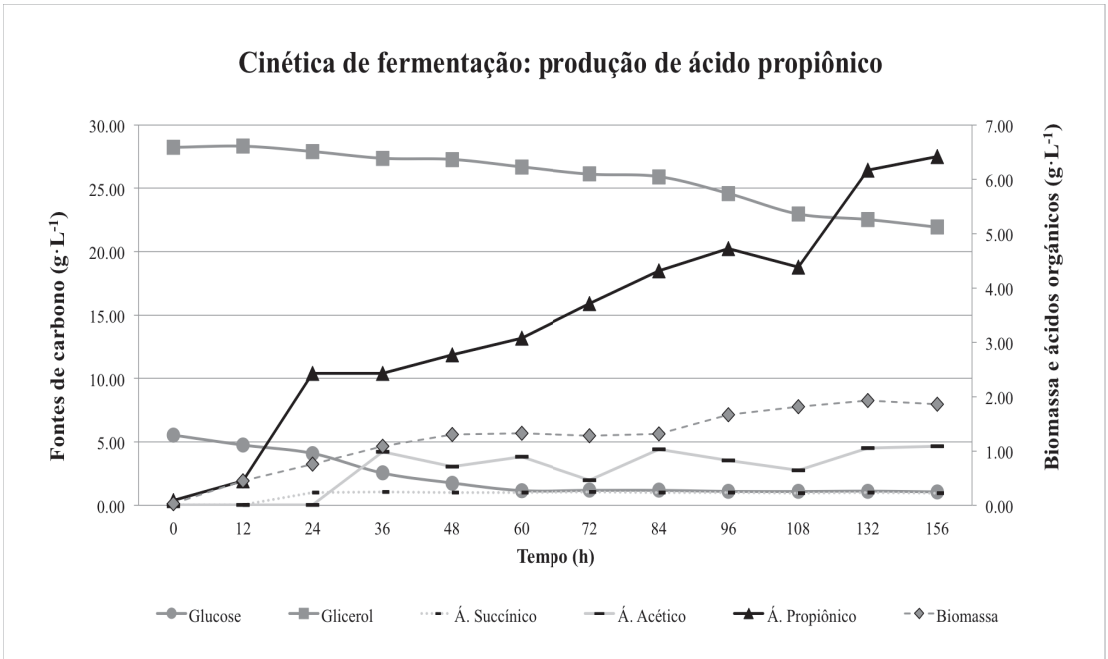
FIGURA 29. PRODUÇÃO DE AP EM BIORREATOR DE BANCADA DE 2 L



FONTE: A autora (2017)

Finalmente, a produção de AP foi avaliada em um biorreator de bancada agitado de 2 L (Figura 29). Com os resultados obtidos durante a fermentação, nas condições de processo descritas na seção 3.6.1.7., a Figura 30, apresenta o comportamento dos parâmetros investigados durante as 156 h de fermentação.

FIGURA 30. CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE AP, REALIZADA POR *P. jensenii* DSM 20274 EM MEIO CONTENDO HIDROLISADO DE CASCA DE CACAU E GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO REALIZADA EM BIORREATOR DE 2 L.



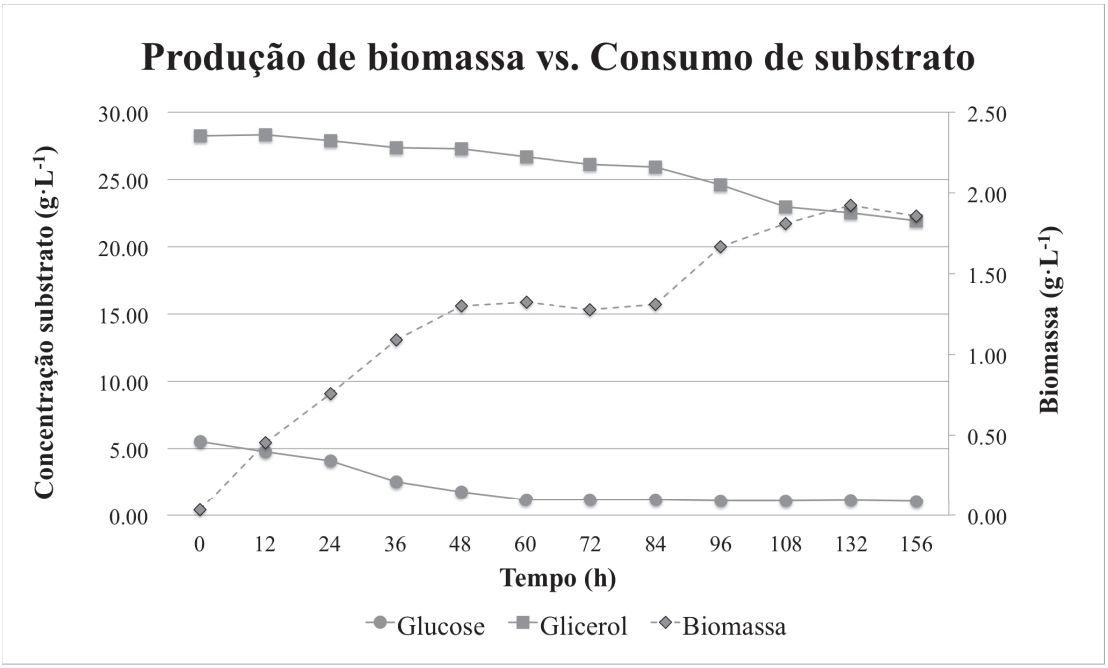
FONTE: A autora (2017)

Da mesma forma que na cinética de fermentação realizada em frascos do tipo *Schott* de vidro de 100 mL, para esta fermentação já em escala maior, procedeu-se a quantificar em intervalos de tempo determinados, os parâmetros de pH, biomassa, consumo de fonte de carbono e produção de AP e de subprodutos.

A concentração máxima de AP foi obtida no final da fermentação após de 156 h de processo com um valor de 6,42 $g \cdot L^{-1}$, enquanto que a maior produtividade, foi alcançada em um tempo de 36 h de fermentação com um valor de 0,068 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$; o maior rendimento: 0,65 (g de AP /g de substrato) após 84 h de processo.

Como é apresentado na Figura 31, a produção de biomassa do microrganismos *P. jensenii* DSM 20274 atingiu uma concentração de 1,92 $g \cdot L^{-1}$. Identifica-se o crescimento exponencial durante as primeiras 48 h de processo, para depois alcançar uma fase estacionária desde às 48 h até as 84 h, tempo a partir do qual aparece uma nova etapa de crescimento do microrganismo e que coincide exatamente com o esgotamento da fonte de carbono proveniente da glucose e o início do consumo acelerado do glicerol (incremento de 5% no consumo), apresentando-se assim, uma fase de readaptação metabólica para uma fonte de carbono. A partir das 132 h, parece que o microrganismo entra de novo em uma fase estacionaria.

FIGURA 31. CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO: CONSUMO DE FONTES DE CARBONO VS. BIOMASSA DE *P. JENSENII* DSM 20274 EM MEIO CONTENDO GLUCOSE DO HIDROLISADO DE CASCA DE CACAU E GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO REALIZADA EM BIORREATOR DE 2 L.



FONTE: A autora (2017)

O consumo de glucose no final do processo foi 80,8% e de 22,5% para o glicerol. Em total a fonte de carbono restante no meio após das 156 h de fermentação correspondeu a 67,9%. Neste caso o microrganismo não conseguiu utilizar totalmente a fonte de carbono, presumivelmente pela falta de acesso a esta, pois durante o processo foi observada uma acumulação de material no fundo do biorreator. Lembrando que, o tipo de agitação foi branda e correspondeu a 50 rpm o que poderia ter influenciado neste fato, pelo que é sugerido para estudos posteriores, a otimização desta variável. As máximas concentrações de AS e AA foram iguais a 0,25 $g \cdot L^{-1}$ e 1,09 $g \cdot L^{-1}$ respectivamente. Para esta cinética de fermentação, o pH do meio iniciou 7,02 e finalizou com um pH de 4,25.

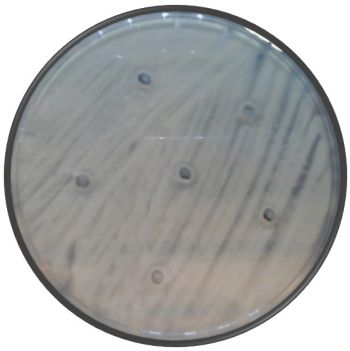
Os resultados atingidos neste estudo para a concentração e produtividades de AP produzidos a partir do hidrolisado da casca de cacau e o glicerol, poderiam ser melhorados, considerando a implementação de diferentes estratégias relacionadas com o tipo de fermentação e controle da atmosfera de fermentação mediante a injeção de N_2. Para este estudo, a implementação do sistema de batelada alimentada não se considerou como viável, toda vez que as fontes de carbono não foram totalmente consumidas durante o processo de fermentação, no entanto, se propõe como técnica importante a ser considerada para estudos futuros. A seguir, se citam alguns exemplos sobre estudos relevantes sobre a produção de AP.

Estudos previamente publicados têm obtido concentrações de até 136,23 ± 6,77 $g \cdot L^{-1}$ de AP após de 240 h (a maior até agora reportada) com uma produtividade de 0,57 ± 0,03 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, implementando o sistema de batelada alimentada e imobilização de células mediante a cepa *P. freudenreichii* CCTCC M207015 e utilizando glucose como fonte de carbono (Chena *et al*., 2012). Também mediante o sistema de batelada alimentada Liu *et al*., (2012) conseguiram atingir uma concentração de 53,2 $g \cdot L^{-1}$ de AP, com a cepa *P. acidipropionici* ATCC 4875 e utilizando hemiceluloses como fonte de carbono. Previamente, realizaram uma fermentação em batelada e obtiveram concentrações de AP de 13,3 $g \cdot L^{-1}$. Em um estudo prévio, Suwannakham (2005) com esta mesma cepa e usando também xilose, mas desta vez em sistema de batelada, atingiu uma concentração de 18,5 $g \cdot L^{-1}$. Com estas referências, vale a pena considerar para futuros estudos a implementação do sistema de fermentação de batelada alimentada. Nos estudos aqui citados, as técnicas de estabelecimento de anaerobiose usadas, foram a geração de vácuo ou o espargimento de nitrogênio. No Quadro 3 apresentam-se diversos exemplos de outros estudos realizados sobre a produção de AP a partir de diferentes fontes de carbono e implementando vários tipos de sistemas de fermentação.

4.2.3. *Teste de aplicação: determinação da atividade antimicrobiana do meio fermentado*

O AP (e seus sais) é um dos ácidos orgânicos de maior importância nos últimos anos como parte dos compostos que apresentam prioridade no desenvolvimento de produção devido à sua dependência do petróleo para ser produzido. Diversas indústrias utilizam este composto, entre as que cabe citar a de fabricação de alimentos para consumo humano (especificamente para a conservação de produtos cárneos e de padaria), indústria farmacêutica (como intermediário de reações para a produção de compostos), a indústria de perfumaria, de fabricação de herbicidas e de fabricação de ração animal. Como parte deste estudo, considerou-se a opção de ensaiar o caráter antimicrobiano do meio fermentado por *Propionibacterium jensenii* DSM 20274. Para tal fim, foi planejado um experimento de avaliação da inibição que poderia ocasionar o caldo fermentado (previamente filtrado, 0,2 μm) sobre microrganismos que provocam problemas sérios sobre os alimentos de consumo animal (especialmente para suínos e aves) o que conduziu a utilizar as cepas dos fungos *Aspergillus flavus* e *Cândida albicans* HC. Como foi citado por Haque *et al.,* (2009) comprovou-se a efetividade do AP como inibidor destes dois microrganismos, em provas desenvolvidas pela empresa BASF.

FIGURA 32. PLACA DE PETRI PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO MEIO DE FERMENTAÇÃO UTILIZADO POR P. *jensenii* DSM 20274.



FONTE: A autora (2017)

Seguiu-se a metodologia descrita na seção 3.8 e foi verificado que o caldo fermentado, usado tal e como é obtido uma vez finalizado o processo, não possui propriedades antifúngicas, pois não foram achados halos de inibição nas placas. Ao invés dos halos de inibição, em alguns dos poços observou-se um crescimento maior do microrganismo utilizado, o que obedeceria provavelmente à disponibilidade de nutrientes ainda remanescentes no meio. Contrário ao esperado, não foi observado um efeito de inibição nos poços contendo AP de grau comercial, utilizado como controle. Levando em conta isto, conclui-se que as concentrações estabelecidas para este experimento, não foram as mínimas necessárias para provocar a inibição dos microrganismos utilizados na prova. Finalmente e conhecendo esta informação, para ensaios posteriores, recomenda-se determinar a concentração mínima inibitória de AP necessária para os microrganismos testados e também investigar o uso do meio uma vez tenha sido concentrado ou purificado para obter novas informações sobre este tema.

5. CONCLUSÕES

- Demostrou-se que as cascas de cacau, consideradas como um resíduo agrícola primário, têm potencial agroindustrial para a produção biotecnológica de compostos de médio a alto valor agregado.
- A comparação da caracterização físico-química mediante diferentes técnicas qualitativas (coloração histológica-MO, MEV, FTIR, DRX e TG) e quantitativas da casca de cacau *in natura* e pré-tratada, permitiu verificar as diversas alterações (estrutura morfológica, conformação química, grau de cristalinidade, estabilidade térmica e de resistência mecânica) ocasionadas pela ação dos compostos químicos e enzimáticos utilizados durante o estudo, o que ratificou para cada caso a eficácia dos processos.
- As condições de hidrólise química e enzimática estabelecidas para o pré-tratamento da casca de cacau (NaOH 2,3% (m/v), durante 30 minutos em autoclave a 120ºC e 1 atm.; seguida por hidrólise com a enzima Cellic® CTec 2 em concentração de 2,4% (v/v), substrato 10% (m/v), 50ºC e 100 rpm), permitiram obter um hidrolisado com uma maior concentração de glucose, quando comparada com as concentrações obtidas para o extrato aquoso, para a posterior obtenção de uma biomolécula de valor agregado.
- Produziu-se AP a partir do hidrolisado das cascas de cacau obtido do pré-tratamento químico e enzimático, com os seguintes valores:
    - Frasco tipo Schott de 100 mL:
        - Concentração máxima: 10,28 $g \cdot L^{-1}$
        - Produtividade: 0,079 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
        - Rendimento: 0,59 g de AP/ g de substrato
    - Biorreator agitado de 2 L:
        - Concentração máxima: 6,42 $g \cdot L^{-1}$
        - Produtividade: 0,068 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
        - Rendimento: 0,65 g de AP/ g de substrato
- Cumpriram-se todos os objetivos específicos estabelecidos para o desenvolvimento deste projeto.

6. PERSPECTIVAS

- As diferentes frações residuais (líquidas e sólidas) obtidas ao longo do processo de obtenção do hidrolisado, permitem propor o estabelecimento de uma biorefinaria com o propósito de valorizar ainda mais este resíduo. Como exemplo, se propõe aproveitar o efluente gerado após do tratamento químico da casca de cacau (presumivelmente rico em ligninas e hemiceluloses) e o resíduo sólido remanescente após do pré-tratamento enzimático.
- Sugere-se estudar a viabilidade da recuperação e reutilização de compostos utilizados durante o tratamento da casca de cacau (NaOH utilizado para o pré-tratamento alcalino e enzima residual)
- Otimizar a produção de AP em biorreator mediante a implementação de sistema de fermentação de batelada alimentada, o controle da atmosfera de fermentação mediante a injeção de N_2 ou CO_2.
- Avaliar o possível uso dos subprodutos AA e AS obtidos durante a produção de AP.
- Concentrar e purificar os caldos de fermentação obtidos para verificar a ação antimicrobiana do AP, iniciando com testes Mínima Concentração Inibitória (MCI).
- Utilizar o hidrolisado para a produção de outras biomoléculas de interesse industrial (exemplo etanol).

7. REFERÊNCIAS

Afoakwa E. O. Chocolate production and consumption patterns. In: E. O. Afoakwa, (Ed.), Chocolate science and technology. Wiley-Blackwell, York, pp. 2-11. doi: 10.1002/9781444319880.ch1. 2010.

Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP. Anuário Estatístico 2016. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuario-estatistico/2441-anuario-estatistico-2016>. Acesso em: março de 2017

Ahmad, F. Daudb W. M. A. W., Ahmadc M. A., Radzi R. Cocoa (*Theobroma cacao* L.*)* shell-based activated carbon by CO_2 activation in removing of cationic dye from aqueous solution: Kinetics and equilibrium studies. Chemical engineering research and design. 90: 1480–1490. 2012.

Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology 101:4851–4861. 2010.

Banco Mundial, Data Bank. Disponível em: <http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL?display=map3E>. Acesso em: Janeiro de 2017.

BASF The chemical company. Conservación efectiva de piensos compuestos con los nuevos productos Lupro-Grain® y Amasil® NA. 2008. Disponível em: <http://www.basfanimalnutrition.de/es/news_2008_09_09.php> Acesso em: Janeiro de 2017.

Boyaval P., Corre C. Production of propionic acid. Le Lait. 75 (4 5), pp. 453-461. 1995

Bradford M. Analytical biochemistry. 72, 248-254, 1976.

Brar S. K., Dhillon G. S., Soccol C. R. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. ISBN 978-1-4614-8005-1 (eBook). 2014

Buschle-Diller G., Zeronian S. H. Enhancing the reactivity and strength of cotton fibers. Journal of Applied Polymer Science. Volume 45, Issue 6. Pages 937–1125. 1992

Cavalieri S. J. (M. B. Coyle Ed.). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. University of Washington. 2005

Centro de referência da cadeia de produção de biocombustíveis para a agricultura familiar. Indicadores de preços médios – Glicerina Bruta. Disponível em: <http://www.biomercado.com.br/indicadoresPorProduto.php?produto=56> Acesso em: março de 2017.

Ceplac, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. 2012

Chen Z., Hu M., Zhu X., Guo D., Liu S, Hu Z., Xiao B., Wang J., Laghari M. Characteristics and kinetic study on pyrolysis of five lignocellulosic biomass via thermogravimetric analysis. Bioresource Technology 192. 441–450. 2015

Chepote, R. E.; Santana, J. L. C.; Deleon, F. Como utilizar composto de casca de cacau na adubação do cacaueiro. Difusão Agropecuária, Ilhéus, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1990.

Chung B. Y., Cho J., Lee S. S., Nishiyama Y., Matsumoto Y., Iiyama K. The relationship between lignin and morphological characteristics of the tracheary elements from cacao (*Theobroma cacao* L.) hulls. Journal of plant biology, 51 (2): 139-144. 2008

Clomburg J, M., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. Trends in Biotechnology. Vol. 31, No. 1. 2013.

Coral J. Propionic acid production by *Propionibacterium sp.* using low- cost carbon sources in submerged fermentation. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2008.

Coral J.; Karp S. G., Vandenberghe L. P. S., Parada J. L., Pandey A., Soccol C. R. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. Applied Biochemistry Biotechnology, v. 151, n. 3, p. 333-341, 2008.

Coral Medina J. D Woiciechowski A., Zandona A., Noseda M. D., Satinder B. K., Soccol C.R. Lignin preparation from oil palm empty fruit bunches by sequential acid/ alkaline treatment – A biorefinery approach. Bioresource Technology 194, 172–178. 2015

Cutler, D. F., Botha T., Stevenson D. W. Plant anatomy: an applied approach. Blackwell Publishing. 2007

Davidson P. M., Sofos John N., Branen A. L. Antimicrobials in Foods, Third Edition. CRC Press, Tylor & Francis Group, LLC. ISBN: 13: 978-0-8247-4037-5. 2005

Dishisha T., Alvarez M. T., Hatti-Kaul R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. Bioresource Technology. 2012

DOW, Chemical company. Folha de dados técnicos para o ácido propiônico. Disponível em: <http://msdssearch.dow.com> Acesso em: Junho 2016

Earnest M. C. Editor. Compositional analysis by thermogravimetry. Special technical publication. ASTM. Philadelphia, PA 19103. 1988.

Feedinfo News Service. Roundtable interview: part 1 – Global organic acid market overview. 2014

Furia T. E. CRC Handbook of food additives, Second Edition. Vol 1. CRC Press. 1973.

Garima B., Meng X., Deneff J. I., Sun Q., Ragauskas A. J. The Effect of Alkaline Pretreatment Methods on Cellulose Structure and Accessibility. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2014

Goswami V., Srivastava A. K. Propionic acid production in an *in situ* cell retention bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol, v. 56, p. 676-680, 2001.

Gupta R. Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis [Ph.D. Thesis]. Auburn, Alabama: Auburn University; 2008.

Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter A., Sluiter J., Templeton D. Preparation of samples for compositional analysis. National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42620, Golden, Colo, USA, 2008.

Haque M. N., Chowdhury R., Islam K. M. S., Akbar M.A. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. Bangladesh Journal of Animal Science. 38 (1&2) 115-122. 2009

Harada P. Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melaço de cana como fontes de carbono. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2012

Hidayat B. J., Felby C., Johansen K., Thygesen L. G. Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. Cellulose 19:1481–1493. 2012

International Trade Center – ITC. Disponível em: <http://www.trademap.org/Index.aspx> Acesso em: março de 2017

Jensen W. A. Botanical Histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 408 p. 1962

Jönsson L. J., Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. Bioresource Technology, Vol. 199. Pages 103–112. 2016

Kim J. S., Lee Y. Y., Kim T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 2015
Knothe G., Krahl J., Van Gerpen J. The biodiesel handbook. 2nd edition. Pg. 439. Elsevier. 2015.

Latham M. C. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), *Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29.* ISBN 92-5-303818-7. Roma, 2002

Lima L. J. R., Almeida M. HNout M. J. R., Zwietering M. H. *Theobroma cacao* L., "The food of the gods": Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. Critical Reviews in food Science and Nutrition, 51:731-761. 2011.

Liu L., Guan N., Zhu G., Li J., Shin H., Du G., Chen J. Pathway engineering of *Propionibacterium jensenii* for improved production of propionic acid. Scientific Reports. 2016.

Liu Z., Ma C., Gao C., Xu P. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. Bioresource Technology 114. 711–714. 2012.

Mansur D., Tago T., Masuda T., Abimanyu H. Conversion of cacao pod husks by pyrolysis and catalytic reaction to produce useful chemicals. Biomass and bioenergy 66 275-285. 2014

Martínez R., Torres P., Meneses M. A., Figueroa J. G., Pérez-Álvarez J. A.; Viuda-Martos M. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. Food Research International. Ecuador. 2012.

Maryana R., Ma'rifatunb D., Wheni I. A., Satriyo K.W., Angga W. R. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. Energy Procedia 47. 250 – 254. 2014.

Mclntosh S., Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. Bioresource Technology; 101:6718–27. 2010.

National Biodiesel Board. Disponível em: <www.biodiesel.org/reports/20110501_gen-427l.pdf> Acesso em: março de 2017

Novozymes A/S – Application sheet. Cellulosic etanol. Novozymes Cellic® CTec and HTec2- Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. 2010

Ofori-Boateng C., Lee K. T. The potential of using cocoa pod husks as green solid base catalysts for the transesterification of soybean oil into biodiesel: Effects of biodiesel on engine performance. Chemical Engineering Journal 220 395–401. 2013.

Oliva J. M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 141–154. 2003.

Osei S. A., Atuahene C. C., Heathcote D., Frimpon E. B., Adomako D. Cocoa pod-and-husk meal as a feed ingredient in layer diets. Anim. Feed Sci. Technol., 35: 283-288.1991

Pandey A., Höfer R., Taherzadeh M., Nampoothiri K. M., Larroche C. Industrial Biorefineries and White Biotechnology. Pg. 414. Ed. Elsevier 2015

Pandey A., Soccol C. R., Fernandes M., Larroche C. Current Developments in Solid-state Fermentation. Springer Science & Business Media. 2008

Park S, Baker J, Himmel M, Parilla P, Johnson D Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. Biotechnol Biofuels 3:10. 2010

Peiter C. G., Alves H. J., Sequinel R., Bautitz I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.5, n.4, p.519-537. 2016.

Prabhakaran Nair K. P. The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World. 131-180. 2010.

Pua f. L., Sajab M. S., Chia C. H., Zakaria S., Rahman I. A., Salit M. S. Alkaline-treated cocoa pod husk as adsorbent for removing methylene blue from aqueous solutions. Journal of Environmental Chemical Engineering 1: 460–465. 2013.

Rodríguez B. A., Stowers C. C., Phama V., Coxb B. M. The production of propionic acid, propanol and propylene via sugar fermentation: an industrial perspective on the progress, technical challenges and future outlook. Royal Society Chemistry. 2014.

Rodrigues C. A., Haven M. O., Lindedamb J., Felby C., Gama M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. Enzyme and Microbial Technology 79. 70–77 2015.

Schaechter M., Encyclopedia of microbiology. 3th Edition. Vol 1. ISBN 978-0-12-373944-5. Ed. Elsevier. 2009

SEBRAE - Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. Boletim: O mercado do cacau como oportunidade para os pequenos negócios. 2014

SEP – Secretaria de Educación Pública de México. Disponível em: <http://basica.primariatic.sep.gob.mx/>. Acesso em: maio de 2017

Silverstein R., Webster F., Kiemle D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2005.

Sluiter A., Hames B., Hyman D., Payne C., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Wolfe J. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621, Golden, Colo, USA, 2008.

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42622, Golden, Colo, USA, 2008.

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42618, Golden, Colo, USA, 2011.

Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. Determination of extractives in biomass. National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42619, Golden, Colo, USA, 2005.

Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production-a review. Bioresource Technology. 2002.

Suwannakham, S. Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici.* PhD thesis, The Ohio State University. 2005.

Syamsiro M., Saptoadi H., Tambunan B. H., Pambudi N. A. A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. Energy for Sustainable Development 16: 74–77. 2012.

The Soap and Detergent Association – SDA. – Glycerine and Oleochemical Division. Glycerine: an overview. 1990.

Theron M., Lues R. Organic Acids and Food Preservation. CRC Press, Tylor & Francis Group, LLC. ISBN: 13: 978-1-4200-7843-5. 2010.

Tinwala F., Mohanty P., Parmar S., Patel A., Pant K. Intermediate pyrolysis of agro-industrial biomasses in bench-scale pyrolyser: Product yields and its characterization. Bioresource Technology 188. 258–264. 2015.

Tufvesson P., Ekman A.; Sardari R.; Engdahl K., Tufvesson L. Economic and environmental assessment of propionic acid production by fermentation using different renewable raw materials. Bioresource Technology. 2013.

Turgay M., Schaeren W., Wechsler D., Bütikofer U., Graber H.U. Fast detection and quantification of four dairy propionic acid bacteria in milk samples using real-time quantitative polymerase chain reaction. International Dairy Journal 61 37 e 43. 2016.

Vriesmann L. C., Dias M. C. A. R., Petkowicza C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. Industrial Crops and Products 34 1173–1181. 2011.

Vriesmann L. C., Teófilo R. F., Petkowicz C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. Carbohydrate Polymers 84. 1230–1236. 2011.

World Atlas. Disponível em: <http://www.worldatlas.com/> Acesso em: abril de 2017

Yennamalli R. M., Rader A. J., Kenny A. J., Wolt J. D., Sen T. Z. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. Biotechnology for Biofuels, 6:136. 2013

Zaia A. M., Zaia B. V., Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química nova, 21(6). Ed. Univates. 1998

Zhang A., Sun J., Wang Z., Yang S., Zhou H. Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. Bioresource Technology 175. 374–381. 2015

Zhong G. Process development of propionic acid production by Fermentation. Retrospective theses and Dissertations. Paper 11799. Iowa State University. 1997.

Zhu Y., Li J., Tan M., Liu L., Jiang L., Sun J., Lee P., Du G., Chen J. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. Bioresource Technology. 2010.

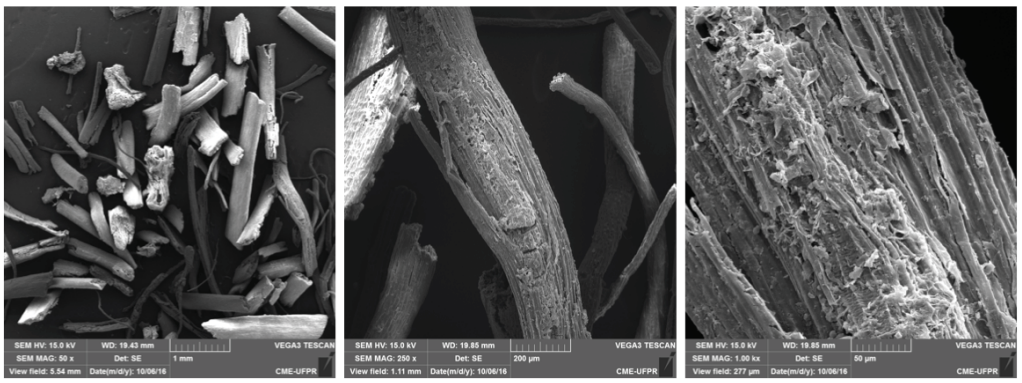
Zhuge X., Liu L., Shin H., Li J., Du G., Chen J. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. Bioresource Technology 152 519–525. 2014

8. APÊNDICES

A. Imagens MEV da casca de cacau com diversos pré-tratamentos

Durante o desenvolvimento deste estudo, diferentes pré-tratamentos foram testados para verificar o efeito sobre a casca de cacau. A seguir, apresentam-se as micrografias MEV dos tratamentos básico, ácido, básico-ácido, ácido-enzimático e micrografias adicionais do tratamento básico-enzimático com as respetivas descrições das estruturas vegetais identificadas e as mudanças estruturais observadas.

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento ácido



Aumento: 50x
Descrição: Visão panorâmica dos fragmentos de cacau submetidos a pré-tratamento ácido. A superfície parece ser lisa e uniforme.

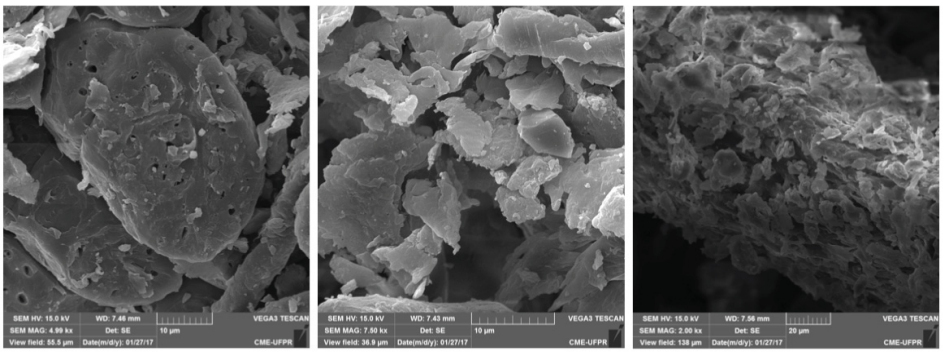
Aumento: 250x
Descrição: Observa-se a degradação mecânica e desgaste químico efetuado na fibra.

Aumento: 1.000x
Descrição: Feixes de fibras em vista longitudinal do fragmento de casca apresentando rompimento do feixe de fibras e material particulado.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-ácido

Descrição: Após do pré-tratamento básico-ácido consecutivo, a casca do fruto expõe degradação não seletiva das estruturas do material. Em todo o material, observa-se a aparição de fragmentos com forma de escamas sem exposição de estruturas definidas como nos outros pré-tratamentos.



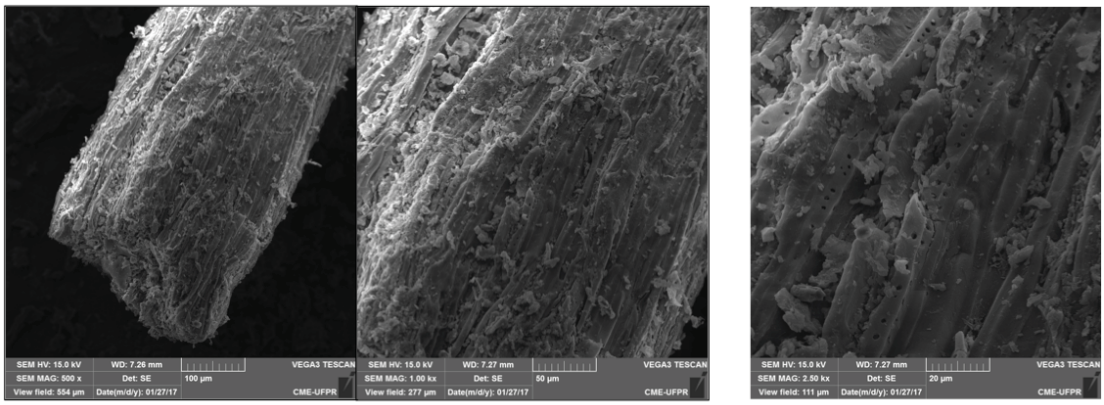
Aumento: 5.000x

Aumento: 7.500x

Aumento: 2.000x

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento ácido-enzimático



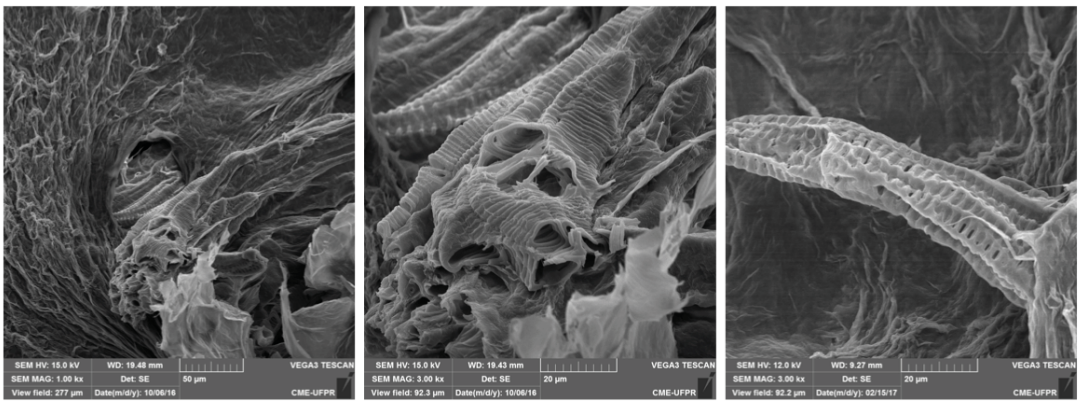
Aumento: 500x | **Aumento:** 1.000x | **Aumento:** 2.500x

Descrição: Feixe de fibras após do pré tratamento ácido-enzimático. Observa-se material particulado acumulado sobre a superfície da fibra.

Descrição: Observa-se uma distribuição alinhada de pontuações ocasionadas durante o tratamento químico e material particulado próprio da casca e produto da degradação ácido-enzimática.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico



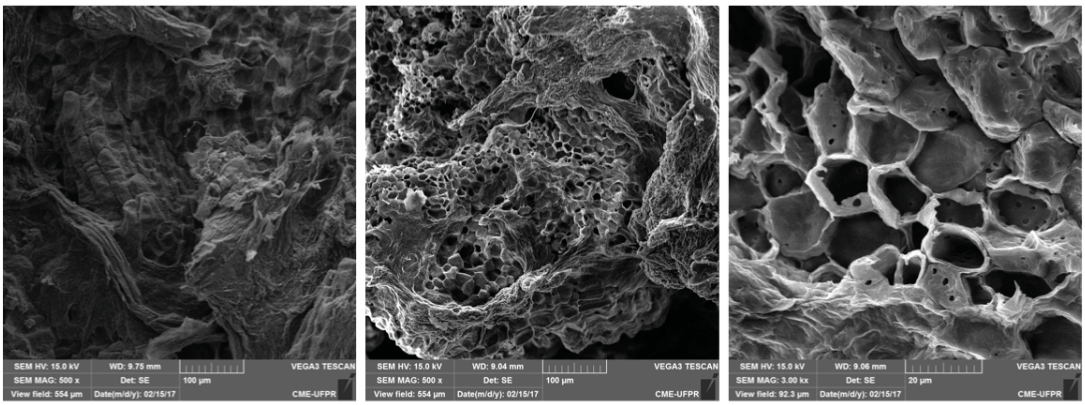
Aumento: 1.000x | **Aumento:** 3.000x | **Aumento:** 3.000x

Descrição: Seção longitudinal do material com pré-tratamento básico. Verifica-se que a superfície do material foi drasticamente alterada, pois é possível observar a exposição dos elementos traqueais do xilema.

- O tratamento promove a retirada de material como lignina e hemiceluloses, deixando a fibra celulósica exposta e disponível para o posterior tratamento enzimático.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico

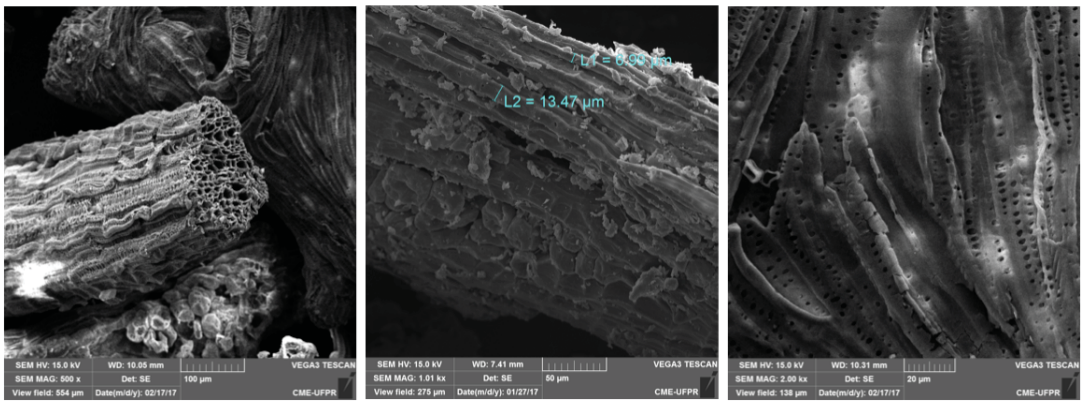


Aumento: 500x **Aumento:** 500x **Aumento:** 3.000x

Descrição: Visão longitudinal do material com pré-tratamento básico. Evidenciam-se estruturas como vasos condutores do xilema. Observam-se células parenquimáticas de diferentes conformações.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático

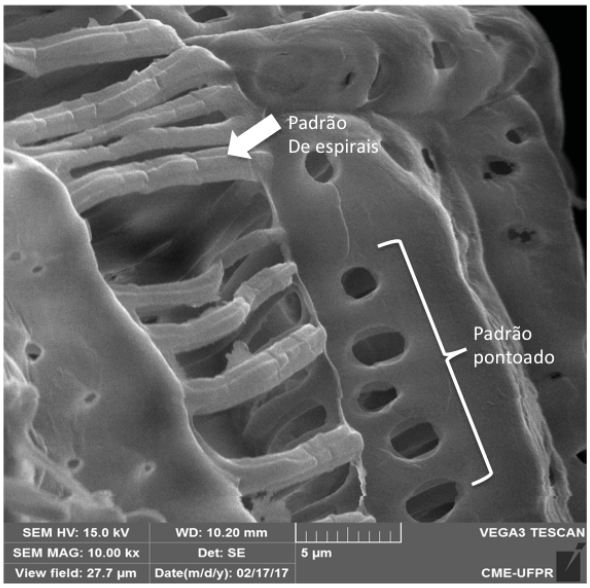


Aumento: 500x **Aumento:** 1.000x **Aumento:** 3.000x

Descrição: Visão longitudinal do material pré-tratado química e enzimáticamente. Na primeira imagem de esquerda a direita, é possível observar claramente um feixe vascular exposto devido à ação do pré-tratamento. Na imagem central, com um aumento maior é determinado o comprimento de dois feixes vasculares. Na imagem da direita, observa-se um padrão pontoado, exposto graças ao efeito do NaOH usado no pré-tratamento inicial.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático

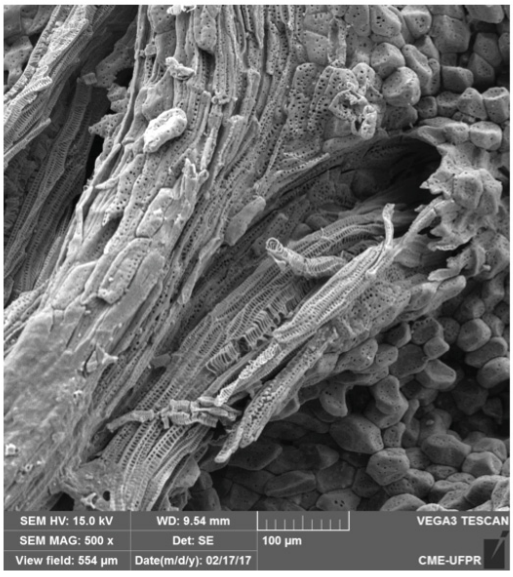


Aumento: 10.000x

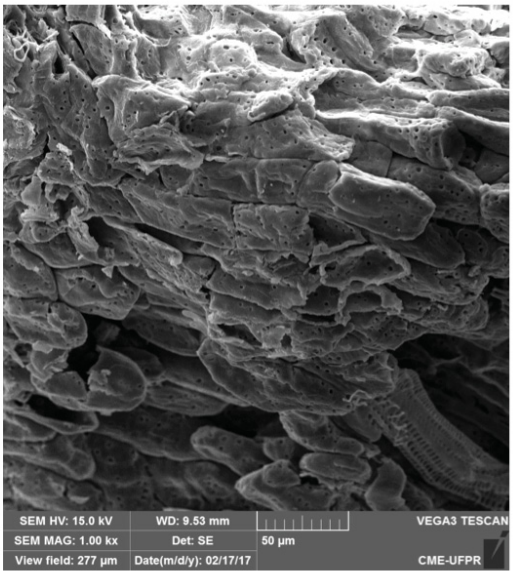
Descrição: Visão longitudinal do tecido vascular da casca de cacau, exibindo conformações estruturais de espiral (característica do protoxilema) e com padrão pontoado dos elementos traqueais.

FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático



Aumento: 500x

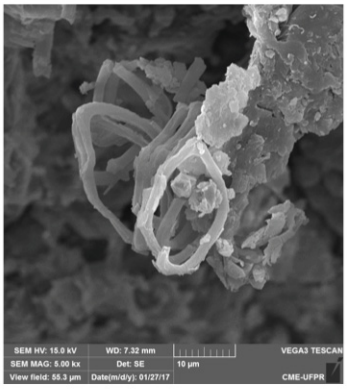


Aumento: 1.000x

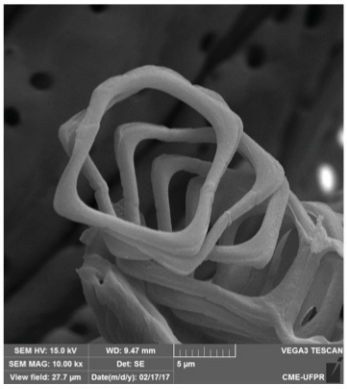
Descrição:
células parenquimáticas em conformações arredondadas e alongadas com aparente degradação estrutural.

FONTE: A autora (2017)

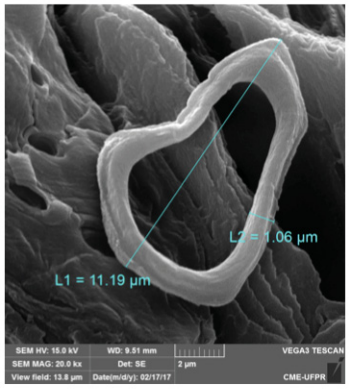
Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático



Aumento: 5.000x



Aumento: 10.000x



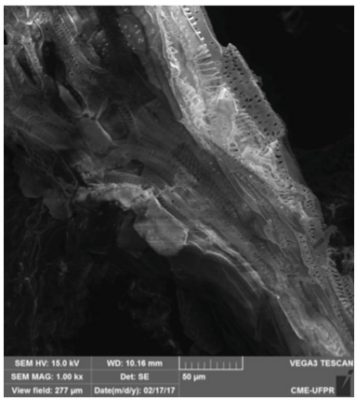
Aumento: 20.000x

Descrição: Protoxilema com padrão de parede secundaria em forma anular.

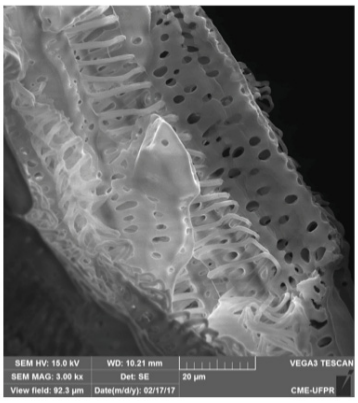
FONTE: A autora (2017)

Micrografia por MEV da casca de cacau com pré-tratamento básico-enzimático

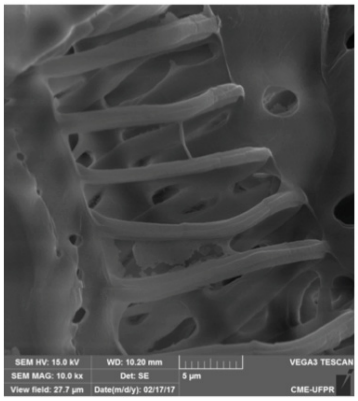
Descrição: Visão longitudinal do tecido vascular da casca de cacau apresentando diferentes configurações estruturais. Protoxilema com padrão de deposição de parede secundaria em espiral e metaxilema perfurado.



Aumento: 1.000x



Aumento: 3.000x



Aumento: 10.000x

FONTE: A autora (2017)

B. Pré-tratamentos químicos para material lignocelulósico

Durante a revisão bibliográfica, compilaram-se os resultados mais relevantes sobre o pré-tratamento (ácido, básico e ácido-básico) de material de natureza lignocelulósica para a produção de etanol (como molécula de referência). A seguir os resultados:

Pré-tratamento		Condições de processo			Matéria prima	Frações removidas			Rendimento de açúcares	Rendimento de etanol	Referência
		Temperatura (°C)	Concentração	Tempo		Lignina	Hemicelulose	Celulose			
Ácido	H_2SO_4	180	0,5% v/v	15 min	Palha de trigo	-	-	-	76%	-	Saha *et al*., 2005
	H_2SO_4	121	0,75% v/v	60 min	Palha de trigo	-	-	-	74%	-	Saha *et al.*, 2005
	H_2SO_4	121	1%	60 min	Palha de arroz	-	-	-	84,22 $g \cdot L^{-1}$	-	Ren *et al.*, 2010
	H_2SO_4 diluído	170	2,20%	30 min	Palha de milho	2,40%	-	-	88%	-	Wang *et a*l., 2011
	H_2SO_4 diluído	120	3%	10 min	Palha de sorgo doce	-	-	-	50%	-	Sukanya and Siriluk., 2011
Alcalino	Amônio	170	2,5 - 20%	60 min	Palha de milho	60-80%	-	-	-	-	Sun *et al.*, 2002
	Hidróxido de amônio +PEG 4000	160	28% 3%	60 min	Bagaço de cana	-	-	-	35,01±1,53	73%	Cao *et al*., 2013
	$Ca(OH)_2$	121	100 mg/g palha	60 min	Palha de arroz	-	-	-	32%	9,8 ± 0,5 $g \cdot L^{-1}$ (SHF) 11,0 ± 1.0 $g \cdot L^{-1}$ (SSF)	Saha and Cotta, 2008
	NaOH	25	6% carga química, g/g de palha de arroz seca	24 h	Palha de arroz	-	-	-	85%	-	Zheng *et al*., 2009
	NaOH	120	1%	30 min	Capim-elefante	88,40%	68,5% recuperado	96,9 % recuperado	82%	26,05 g/L	Eliana *et al*., 2014
	NaOH	90	0,50%	1 h	Capim-swith	-	-	-	31%	-	Nlewem *et al*., 2010
	NaOH	150	10%	30 min	EFB	-	-	-	87% -	76% 97%	Dahnum *et al., 2015*
	NaOH	30	1%	48 h	Palha de arroz	-	-	-	92,6%	-	Cabrera *et al.*, 2014
	NaOH	100	1 N	30 min	Bagaço de cana	59,1%	-	40%		-	Maryana *et al*., 2014
	NaOH	60	0,5 N	24 h	Bagaço de cana	-	-	-	70,7%	-	Rivers *et al.*, 1984
	NaOH	121	0,5 – 2,0	60 min	Cevada e palha de trigo	20 - 85%	7 - 40%	70-90%		-	Chen *et al*., 2007
	H_2O_2 NaOH	25 - 35	0 – 4,3	3 – 24 h	Palha de trigo	-	-	-	56% açúcares totais	-	Saha and Cotta, 2006
	H_2O_2 NaOH	50	2%	2,5 h	Palha de trigo	14 - 15	13-Aug	31-40		-	Sun *et al*., 2004
	H_2O_2 NaOH	30	1%	24 h	Palha de arroz	-	-	-	91,9%	-	Cabrera *et al*., 2014
	NaOH NaOH/ureia	15/23/60	1-12% 1-7% /12%	2-24 h	Chips de abeto	19%	40%	91%	70%	-	Zhao *et al*., 2008
Ácido + Alcalino	H_2SO_4	121	1%	45 min	Bagaço de cana	-	-	-	-	-	Maeda *et al.*, 2011
	NaOH	121	4% m/v	30 min							
	H_2SO_4	30	60% v/v	4 h	Biomassa de grama tipo kans	-	-	-	85%	-	Chaudhary *et al.*, 2012
	NaOH	100	10%	1 h							
	H_2SO_4	121	0,7% m/v		EFB	-	-	-	51,30%	-	Aziz *et al*., 2002
	NaOH	121	2% m/v	120 min							