

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE REJEITOS DE
ALIMENTOS DO RESTAURANTE UNIVERSITÁRIO DA UFRRJ

DILSON FAGUNDES RIBEIRO

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLGIA
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE REJEITOS DE
ALIMENTOS DO RESTAURANTE UNIVERSITÁRIO DA UFRRJ**

DILSON FAGUNDES RIBEIRO

Sob a orientação da Professora Doutora

Lucielen Oliveira Dos Santos

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Engenharia de Alimentos.

Seropédica, RJ
Março de 2013

660.28449

R484p

T

Ribeiro, Dilson Fagundes, 1986-
Produção de álcool a partir de
rejeitos de alimentos do Restaurante
Universitário da UFRRJ / Dilson
Fagundes Ribeiro. - 2013.
xiv, 62 f.: il.

Orientador: Lucielen Oliveira dos
Santos.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
2013.

Bibliografia: f. 42-49.

1. Álcool - Teses. 2. Fermentação
- Teses. 3. Resíduos industriais -
Reaproveitamento - Teses. 4. Energia
- Fontes alternativas - Teses. 5.
Saccharomyces cerevisiae - Teses. I.
Santos, Lucielen Oliveira dos, 1977-
. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

DILSON FAGUNDES RIBEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de concentração em Engenharia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/03/2013

Prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos
(orientadora)

Prof.^a PhD Rosa Helena Luchese
(membro interno)

Dr.^a Janine Passos Lima
(membro externo)

Adquire a sabedoria e a inteligência e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca. Não desampares a sabedoria, e ela te guardará; ama-a, e ela te conservará. A sabedoria é a coisa principal; adquire, pois, a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquire o conhecimento. Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará.

Provérbios 4: 5-8

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me dado condições de realizá-lo e de aprender todas as coisas que aos meus olhos seriam impossíveis. Aos meus familiares, em especial minha avó Geralda Vieira e meus pais, José das Graças e Maria Aparecida, que não mediram esforços pra que eu pudesse chegar até aqui. A todos os irmãos da Igreja Cristã Maranata, que oraram por mim nos momentos em que precisei. Aos amigos que estiveram junto de mim neste momento, presenciando cada luta, cada esforço e momentos alegres.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado condições de seguir em frente com meus estudos e por ter me dado entendimento para a realização deste trabalho e estar comigo em todos os momentos.

A minha família pelo apoio, amor, por terem lutado pra que eu pudesse chegar até aqui.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo ensino de qualidade, por ter me acolhido durante a graduação e mestrado.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ pelo apoio e profissionalismo.

À prof. Lucielen Oliveira dos Santos pela orientação, por ter participado do meu crescimento intelectual, pelo incentivo nos estudos, pela atenção e pelas advertências construtivas.

Ao professor Romulo Cardoso Valadão pelo ensino, pela amizade, companheirismo, atenção, ética e respeito comigo e com todos os alunos que o cercam.

À professora Simone Pereira Mathias pela atenção em todos os momentos no decorrer dos meus experimentos.

A todos os membros da Banca Examinadora que contribuíram através de seu conceituado conhecimento e experiência científica para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas – LAAB, aos técnicos, professores responsáveis e demais profissionais que o integram, entre eles Luciana da Costa, Rosa Helena Luchese e Elizângela dos Santos, por terem me acolhido para a realização de algumas análises.

À técnica do Laboratório de Microbiologia, Ediná Rodrigues, pelas instruções, amizade e companheirismo.

À técnica do laboratório de Processos Fermentativos, Edlene Ribeiro, pelo apoio, instrução, amizade.

Ao técnico do Laboratório de Análises Instrumental, Juarez Vicente, pelos esclarecimentos, amizade, pelas brincadeiras que eu teimava em acreditar serem verdades.

Aos alunos de iniciação científica envolvidos com meu projeto de mestrado, Juliane Guedes, Thaiani Divino, Matheus Augusto e Karina Coelho, pelo apoio.

Ao Restaurante Universitário da UFRRJ, aos funcionários e em especial a Matildes das Dores de Oliveira Carneiro pela autorização de coleta de resíduos e pelos dados fornecidos.

A Cristiane Tavares por todo o apoio prestado e amizade maravilhosa.

A CAPES pela bolsa concedida.

A mim mesmo, por ter criado coragem para um trabalho cheio de desafios.

A todos os irmãos da Igreja Cristã Maranata que oraram por mim nos momentos que precisei.

Aos amigos que estiveram comigo nesse momento, entre eles Nídia Alves, Karen Romano, Kamila Nascimento, Jéssica Machado, Nathália Rocha, Letícia Scotellano, Ingrid da Mata, Victor Cypriano, Jair Melo, Kelly Hashimoto, Ivan Paulo Bianco, Roberto Laureano e aos muitos que não citei, meu muito obrigado por me ouvirem, pelas conversas, pelos sonhos compartilhados, pelas advertências feitas para o meu crescimento profissional e pessoal.

NOMENCLATURA

ATCC – Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello

CH₄ – Metano

CNI – Confederação Nacional das Indústrias

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

FAO – Food Agriculture Organization of the United Nations

FPU – Atividade em filtro de papel

HCl – ácido clorídrico

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KH₂PO₄ – fosfato diácido de potássio

NaOH – hidróxido de sódio

(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio

p/v – peso por volume

PG – enzima poligalacturonase

pH – potencial hidrogeniônico

R. U. – Restaurante Universitário

rpm – rotação por minuto

t/d – tonelada por dia

U/g – unidades por grama

UAN – Unidade de Alimentação e Nutrição

UFC – Unidade formadora de colônia

UNICA – União da Indústria da Cana-de-açúcar

YM – Yeast Malt

RESUMO

RIBEIRO, Dilson Fagundes. **Produção de álcool a partir de rejeitos de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ**. 2013. 62p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O etanol pode ser obtido de matérias-primas convencionais como a cana-de-açúcar, a beterraba e o milho. Recentemente tem sido dada atenção para pesquisas que buscam a produção de etanol a partir de fontes alternativas, como resíduos de alimentos, o que pode proporcionar um novo método de tratamento ao conteúdo de matéria orgânica e contribuir para a segurança energética. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de etanol a partir de rejeitos de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ. Para tal, estes resíduos foram caracterizados, investigaram-se as concentrações de H_2SO_4 (0,5; 0,75 e 1% p/v) que promovam a melhor hidrólise dos resíduos e estudou-se a influência das variáveis pH, concentração de inóculo, temperatura, concentração de $(NH_4)_2SO_4$ e concentração de KH_2PO_4 durante a etapa de fermentação, sendo utilizado delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} . A levedura utilizada para a produção foi a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 e as fermentações foram realizadas em frasco Erlenmeyer. Os resultados mostraram que em média os resíduos de alimentos possuem 68,74% de umidade, 12,94 % de carboidratos, 6,26% de lipídios, 6,37 de proteínas, 2,71 % de cinzas e 2,98 % de fibra. A concentração de H_2SO_4 que promoveu a obtenção da maior quantidade de açúcares redutores (44,63 g/L) foi a de 1 %. Através da análise estatística empregada, a estimativa dos efeitos ao nível de confiança de 90% para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 mostrou que foram consideradas significativas as variáveis pH e temperatura. Para a resposta produção de etanol nenhuma das variáveis foram significativas. A melhor concentração de etanol foi de 2,46 g/L, com rendimento de 0,53 $g_{etanol}/g_{açúcares}$ e produtividade de 0,005 g/L.h. Portanto, a produção de etanol a partir dos resíduos de alimentos foi possível e se constitui em uma fonte alternativa de matéria-prima e de tratamento para os resíduos que em sua maioria não são devidamente tratados.

Palavras chaves: resíduos de alimentos, hidrólise ácida, *Saccharomyces cerevisiae*, produção de etanol.

ABSTRACT

RIBEIRO, Dilson Fagundes. **Alcohol production from food waste in the University Restaurant UFRRJ**. In 2013. 62p Dissertation (Master Science in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The ethanol can be obtained from conventional materials such as cane sugar, beet and corn. Recently attention has been given to research that attempts to produce ethanol from alternative sources, such as food waste, to provide a new method for the treatment of organic matter coupled with the fact energy security. The objective of this work was to study the production ethanol from food waste from Restaurant of University of UFRRJ. These residues were characterized, investigated the concentration of H_2SO_4 (0.5, 0.75 and 1% w/v) to promote the hydrolysis of the waste and better studied the influence of the varying pH, inoculum, temperature, concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 concentration during fermentation step and was used fractional factorial design 2^{5-1} . The yeast was used to produce the *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 and fermentation was carried out in Erlenmeyer flask. The results showed that on average food waste 68.74% moisture, 12.94% carbohydrates, 6.26% protein, 2.71% ash and 2.98% of fiber. The concentration of H_2SO_4 which promoted obtaining the largest quantity of reducing sugar (44.63 g/L) was 1%. Through statistical analysis employed, the estimate of the effects of the 90% confidence for the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 showed that were significant variables pH and temperature. Response to ethanol production none of the variables were considered. The best ethanol concentration was 2.46 g/L, yield $0.53 \text{ g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{sugar}}$ and 0.005 g/L.h. Therefore, the production of ethanol from food waste was possible and constitutes an alternative source of raw material and treatment wastes which mostly are not properly treated.

Key words: food residues, acid hydrolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Estimativa da composição de resíduos sólidos urbanos coletados no Brasil em 2008	6
Tabela 2:	Estimativa da porcentagem de resíduos (%) para cada grupo de alimentos, desde a produção até o consumo para a América Latina.	7
Tabela 3:	Plantas pilotos de produção de etanol a partir de resíduos Agroindustriais e lixo urbano	8
Tabela 4:	Quantidade de alimentos desperdiçados em um restaurante institucional de uma metalúrgica de Piracicaba	8
Tabela 5:	Níveis codificados e reais	25
Tabela 6:	Matriz dos níveis codificados das variáveis estudadas no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}	26
Tabela 7:	Composição centesimal do resíduo de alimentos da UFRRJ em base úmida	29
Tabela 8:	Concentração de açúcares redutores nas amostras hidrolisadas	30
Tabela 9:	Concentração de açúcares redutores e variação de pH em 0, 24 e 48 h	34
Tabela 10:	Concentração de etanol (g/L) em 24 e 48 h, rendimento (g/g), rendimento (%) e produtividade (g/L.h)	36
Tabela 11:	Crescimento celular em UFC/mL	37
Tabela 12:	Estimativa dos efeitos para a concentração celular (UFC/mL) para 48 h	39
Tabela 13:	Estimativa dos efeitos para a concentração de etanol (g/L) em 48 h	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Transformação de glicose em etanol	10
Figura 2: Foto dos meios esterilizados com escurecimento, indicando possível reação de Maillard	33

SUMÁRIO

NOMENCLATURA.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos Específicos:	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Produção de Etanol a Partir de Fontes Renováveis	4
3.2 Produção de Etanol Utilizando Processos Fermentativos	9
3.3 Bioquímica da Fermentação Alcoólica	10
3.4 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica.....	11
3.5 Processos Hidrolíticos para Obtenção de Açúcares Fermentescíveis	12
3.5.1 Hidrólise química.....	13
3.5.2 Hidrólise enzimática	15
3.5.3 Hidrólise química e enzimática combinadas.....	16
3.6 Micro-organismos Utilizados Para a Produção de Etanol	17
3.7 Substratos e Processos Fermentativos Utilizados na Produção de Etanol	20
3.7.1 Produção de etanol a partir de resíduos da agroindústria de alimentos	20
3.7.2 Produção de etanol a partir de resíduos de alimentos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Coleta e Preparo dos Resíduos do Restaurante Universitário	24
4.2 Micro-Organismo e Obtenção de Inóculo.	24
4.3 Hidrólise Ácida.....	24
4.4 Fermentação Submersa.....	25
4.5 Planejamento Experimental.....	25
4.6 Determinações Analíticas	26
4.6.1 Determinação da composição centesimal	26

4.6.2	Determinação da concentração celular	27
4.6.3	Determinação do pH	27
4.6.4	Determinação da concentração de açúcares redutores nos ensaios de fermentação	27
4.6.5	Determinação do teor alcoólico	27
4.7	Cálculos	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1	Caracterização dos Resíduos	29
5.2	Hidrólise Ácida.....	30
5.3	Produção de Etanol – Delineamento Fatorial Fracionado	34
6	CONCLUSÕES	40
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de diferentes formas de obtenção de energia tem crescido nos últimos anos, devido às preocupações referentes à estimativa de duração das reservas do petróleo, bem como as questões ambientais decorrentes da emissão dos gases poluentes por combustíveis fósseis e pela disposição inadequada de resíduos de matéria orgânica com potencial para fonte de biomassa. Tais preocupações levam a busca por alternativas viáveis de produção de energia e também de etanol, que garantam o abastecimento e promovam o desenvolvimento sustentável.

Diante deste fato, várias pesquisas têm chamado a atenção para o desenvolvimento de métodos que viabilizem o processo de produção de etanol sem ocasionar danos ao meio ambiente e sem oferecer riscos, futuramente, quanto a competição por alimentos.

Pensando na utilização de recursos que não ofereçam riscos ao meio ambiente e a segurança alimentar, novas formas de obtenção do etanol têm sido propostas, uma delas é a utilização de resíduos agroindustriais e alimentares que sejam ricos em carboidratos ou celulose como fonte de açúcares fermentescíveis.

Para a produção de álcool é significativo o gasto com a utilização de matéria-prima convencional, como a cana-de-açúcar e o milho, que conseqüentemente é repassado ao consumidor. A utilização de resíduos como fonte de substrato para a produção de etanol possui como atrativo o baixo custo com a obtenção de matéria-prima e proporciona um novo método de descarte e tratamento de resíduos orgânicos, que em sua maioria não tem sido devidamente tratados ou aproveitados para outros fins.

Os resíduos de alimentos possuem elevado teor de água e facilidade de se decompor. Quando aterrados, podem contaminar as águas subterrâneas e quando queimados, podem liberar gases tóxicos como dioxinas e envolver grandes gastos de energia devido a umidade alta. Deste modo, a utilização destes resíduos para a produção de etanol proporcionará um fim adequado e que poderá suprir a crescente demanda por etanol no Brasil e no mundo.

Os Restaurantes Universitários geram resíduos como cascas e sobras das refeições, que constituem boa fonte de substrato para a produção de etanol por fermentação, a um baixo custo. Por serem ricos em nutrientes, podem proporcionar meios de cultivos ricos em fontes de carboidrato, nitrogênio e sais minerais que são importantes para o desenvolvimento de micro-organismos como a *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a produção de etanol utilizando resíduos de alimentos coletados das sobras dos pratos do Restaurante Universitário da UFRRJ é necessário uma etapa prévia de hidrólise, para tornar os carboidratos disponíveis aos micro-organismos, pois grande parte dos açúcares presentes nos alimentos encontram-se na forma de açúcares não-fermentescíveis. Tal etapa pode ser realizada por processos físicos, químicos, biológicos ou pela combinação de um ou mais processos.

Na literatura pesquisada foram encontrados diversos trabalhos utilizando enzimas e processos combinados de ácido e enzima, porém pouca atenção foi dada ao tratamento químico com ácido sulfúrico (H_2SO_4) para a hidrólise de resíduos de alimentos, o que serviu de incentivo para o presente trabalho. Portanto, o uso de ácido diluído para hidrólise de resíduos de alimentos carece de pesquisas que possam esclarecer as melhores condições de tratamento que possam promover o melhor rendimento e diminuir os gastos com as etapas de produção de etanol, visto que o uso de enzimas hidrolíticas pode ser mais oneroso quando comparado com o uso de ácidos diluídos. Assim, os resíduos após a sacarificação podem ser utilizados como substrato para a produção de etanol por fermentação submersa em batelada.

Este trabalho torna-se relevante uma vez que promoverá o desenvolvimento de alternativas viáveis a utilização dos resíduos de cozinha, que normalmente não são corretamente descartados, bem como a produção de etanol a partir de matéria prima de baixo custo, que não compete com grãos destinados à alimentação, além de suprir a crescente demanda de combustíveis nos últimos anos e minimizar os impactos ambientais causados pela disposição inadequada de material orgânico na natureza.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de etanol a partir de rejeitos de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ, Campus Seropédica - RJ.

2.1 Objetivos Específicos:

- Caracterizar o resíduo de alimentos quanto a sua composição centesimal média;
- Determinar a concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4) que promova o maior rendimento durante a etapa de sacarificação;
- Estudar a influencia das variáveis $pH_{inicial}$, temperatura, concentração de inóculo, concentração de sulfato de amônia e concentração de fosfato diácido de potássio, na produção de etanol durante a etapa fermentativa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de Etanol a Partir de Fontes Renováveis

A economia mundial é altamente dependente de fontes de energia fósseis, como o petróleo, o carvão mineral e o gás natural, para obtenção de combustível, eletricidade e outros produtos. Com aumento da população mundial e a prosperidade das indústrias, o consumo de energia também aumentou gradualmente (SARKAR et al., 2012)

Pesquisas apontam para o esgotamento progressivo das reservas de petróleo no mundo, pois o descobrimento de novas reservas de petróleo não acompanha o crescimento do consumo. Estima-se que as reservas mundiais de petróleo durariam em torno de 41 anos e no Brasil cerca de 18 anos, as de gás natural durariam 67 anos (BRASIL, 2006). A população mundial utiliza cerca de 20% a mais de recursos naturais do que o planeta é capaz de repor, avançando o uso nas reservas naturais (LEITE e PAWLOWSKY, 2005).

Devido às preocupações econômicas e ambientais, muitas pesquisas buscam fontes renováveis de combustíveis líquidos em substituição ao de origem fóssil. A queima de combustíveis fósseis como o petróleo e o carvão mineral libera CO₂ na atmosfera, que é um dos principais responsáveis pelo aquecimento global (KUMAR et al., 2009).

É crescente a demanda por etanol nos últimos anos devido a sua ampla utilização em diversos produtos industrializados e como combustível. Grande parte de sua produção é oriunda do cultivo de milho, nos Estados Unidos e na China, e de cana-de-açúcar, no Brasil (YAN et al., 2011). A importância do etanol pode aumentar devido às razões ambientais e devido ao esgotamento das reservas de petróleo bruto, muitos países estão mudando o foco em direção a fontes renováveis de energia e tem se estendido ao combustível de transporte, devido ao potencial para substituir a gasolina (SARKAR et al., 2012).

O uso extenso e excessivo da terra destinada exclusivamente a produção de matéria-prima para a produção de etanol, tem feito surgir preocupações acerca de impactos sobre a disponibilidade e o aumento dos preços dos alimentos para o consumo humano (CHESTER e MARTIN, 2009).

Recentemente, tem sido dada a atenção para pesquisas que busquem a produção de etanol a partir de resíduos de biomassa, como resíduos de milho, de madeira e de alimentos, por serem atraentes do ponto de vista econômico por se tratarem de matéria-prima de baixo custo (YAN et al. 2011). A atenção se volta para o processamento de resíduos de alimentos ricos em açúcares que podem ser convertidos em produtos mais atraentes, como o ácido lático e o etanol (TANG et al., 2008).

A conversão de biomassa lignocelulósica em combustível é uma alternativa viável para a melhoria da segurança energética e para a redução da emissão de gases do efeito estufa, pois com biocombustíveis reduz-se cerca de 86% a emissão de CO₂ na atmosfera (KUMAR et al., 2009). Além de estar livre de enxofre, o etanol pode ser utilizado puro ou combinado a gasolina (VELÁSQUEZ et al., 2013).

As emissões de CO₂ na atmosfera somaram, em 2005, 2,2 bilhões de toneladas em CO₂ equivalente e estudos apontam que quando comparados a gasolina, o consumo de etanol reduz em cerca de 90% destas emissões (CNI, 2012).

Em todo o mundo, há incentivos e políticas públicas voltadas para o aumento da utilização de biomassa para atender as demandas por energia no futuro e para atender as metas

propostas pelo Protocolo de Quioto de redução de dióxidos e diminuir a dependência por combustíveis fósseis (SARKAR et al., 2012).

Independentemente da finalidade da energia produzida seja para aquecimento, eletricidade ou transporte, fontes renováveis apresentam grande potencial técnico para suprir grande parte do acréscimo da demanda de energia mundial, porém a disponibilidade dos recursos pode variar de uma região para outra. Em se tratando de lixo, estes variam de acordo com o tamanho do município (BRASIL, 2006).

No Brasil há incentivo do governo para pesquisas que busquem a produção de etanol combustível adicional a partir da hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar, onde tecnologias em desenvolvimento poderão atingir o estágio comercial em 10 a 15 anos (BRASIL, 2006).

Os resíduos de cozinhas, provenientes de restaurantes, cafeterias, casas, hospitais, dentre outros, possuem cerca de 80% de umidade, tem facilidade de apodrecer e gerar odor desagradável. Por se tratarem de alimentos, possuem grande quantidade de nutrientes como lipídios, proteínas e carboidratos entre outras substâncias e, geralmente, não possuem compostos nocivos (WANG et al., 2001). O acúmulo destes resíduos pode atrair parasitas, emitir gases tóxicos e contaminar lençóis freáticos, devido à alta concentração de compostos orgânicos, o que requer tratamento da água residual (YAN et al., 2011b).

Uma forma muito utilizada para o aproveitamento de resíduos orgânicos é a utilização como fertilizantes e para a alimentação animal, prática que tem sido muito criticada por criar problemas de higiene para a alimentação animal (YAN et al., 2011). Como tratamento, os aterros sanitários são o principal destino, que nem sempre podem evitar possíveis danos ao meio ambiente devido à formação de lixiviados (chorume) (YAN et al., 2011). O volume de resíduos provenientes de cozinhas tem aumentado a cada ano e provocado o esgotamento dos aterros sanitários e falta espaço para a criação de novas áreas de descartes (CHO et al., 1995 apud YAN et al., 2011).

A maior parte do lixo de cozinha é incinerada diretamente e pode levar a formação de dioxinas e envolver grandes gastos de energia, devido à presença de alto teor de água. Alguns métodos de tratamentos mais econômicos, como a compostagem e a digestão anaeróbica tem sido utilizados para tratar resíduos orgânicos para produzir adubo e biogás, mas o desequilíbrio na oferta e na demanda por produtos reciclados dificulta uma maior aplicação desta prática (TANG et al., 2008).

Com tecnologia adequada é possível usar o conteúdo orgânico como matéria-prima para a produção de etanol e simultaneamente reduzir os problemas causados com o despejo destes resíduos em depósitos ou aterros (CHESTER e MARTIN, 2009).

No Brasil, os resíduos sólidos apresentam uma elevada quantidade de matéria orgânica e apesar do grande volume produzido, as experiências de compostagem para o tratamento são incipientes devido a escassa coleta seletiva, que faz com que o conteúdo orgânico seja encaminhados para disposição final junto com outros resíduos domiciliares, o que acarreta em gastos, para a maioria dos municípios, que poderiam ser evitados caso houvesse uma coleta seletiva adequada. No Brasil, apenas 211 municípios possuem unidades de tratamentos de resíduos de matéria orgânica via compostagem, sendo que os Estados de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul possuem a maioria delas, com 78 e 66 unidades, respectivamente (BRASIL, 2012).

Com a coleta seletiva, a reciclagem e a compostagem do lixo orgânico (resíduos de alimentos) podem reduzir o volume de resíduos a serem dispostos de forma incorreta, contribuindo de forma significativa para solucionar questões a cerca da destinação final destes resíduos e minimizando os problemas causados pela disposição inadequada que leva a

produção de metano (CH₄), produto da decomposição anaeróbia da matéria orgânica (IBGE, 2012).

Na Tabela 1 pode ser observado o volume em toneladas por dia de resíduos sólidos urbanos gerados no Brasil no ano de 2008. Do total de 183481,50 t/d de resíduos sólidos coletados por dia no Brasil, 94335,10 t/d são resíduos de matéria orgânica, o que corresponde a 51,4% de resíduos. Do total estimado de lixo orgânico coletado, somente 1509 t/d, cerca de 1,6%, é encaminhado para tratamento via compostagem (BRASIL, 2012).

Tabela 1: Estimativa da composição de resíduos sólidos urbanos coletados no Brasil em 2008

Resíduos	Participação (%)	Quantidade (t/dia)
Material reciclável	31,9	58527,40
Metais	2,9	5293,50
Aço	2,3	4213,70
Alumínio	0,6	1079,90
Papel, papelão, tetrapak	13,1	23997,40
Plástico total	13,5	24847,90
Plástico filme	8,9	16399,60
Plástico rígido	4,6	8448,30
Vidro	2,4	4388,60
Matéria orgânica	51,4	94335,10
Outros	16,7	30618,90
Total	100,0	183481,50

Fonte: Brasil, 2012

Assim, pesquisas que visem a utilização de resíduos de alimentos e resíduos agroindustriais para a produção de outros produtos, como ácido lático, hidrogênio e etanol poderão ampliar as opções de destinação e tratamentos para o material orgânico.

Segundo Ricarte et al. (2008) o desperdício de alimentos envolve desde alimentos que não foram preparados, as sobras dos pratos dos clientes consumidores, alimentos que foram preparados e não foram servidos e que possuem como destino o lixo. Abrange as principais etapas da cadeia alimentar: produção, comercialização, sistema de embalagem e armazenamento.

Na Tabela 2 é apresentada a estimativa da porcentagem de alimentos perdidos ou de resíduos em todas as etapas do processo de produção até o consumo final para a América Latina. Pode-se perceber que em todas as etapas há perdas de alimentos ou são gerados resíduos, em especial pode-se perceber a considerável perda de produtos como cereais, raízes e tubérculos, sementes, frutas e legumes, que possuem como características da sua composição amido e celulose, que podem ser utilizados como fonte de nutrientes para a produção de etanol.

Tabela 2: Estimativa da porcentagem (%) de resíduos para cada grupo de alimentos, desde a produção até o consumo para a América Latina

	Produção agrícola%	Pós-colheita e manuseio %	Processamento e acondicionamento %	Distribuição %	Consumo %
Cereais	6	4	2,7	4	10
Raízes e tubérculos	14	14	12	3	4
Sementes oleaginosas	6	3	8	2	2
Frutas e legumes	20	10	20	12	10
Carnes	5,3	1,1	5	5	6
Peixe e frutos do mar	5,7	5	9	10	4
Leite	3,5	6	2	8	4

Fonte: FAO, 2011

Não há em escala industrial nenhuma planta para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos, apenas plantas pilotos (GONÇALVES FILHO, 2011). Na Tabela 3, podem ser observadas as plantas pilotos de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos em diversos países no mundo, entre elas, há uma destinada a produção de etanol a partir de resíduos urbanos em Phoenix nos Estados Unidos. Cabe ressaltar também a presença de uma planta brasileira que estuda a hidrólise do bagaço de cana.

Augustini et al. (2008) investigaram o desperdício de alimentos em um restaurante institucional de uma empresa metalúrgica em Piracicaba–SP levando em consideração os restos deixados nos pratos, foi realizado a média de cada refeição em gramas desperdiçados por pessoa, levando-se em consideração que eram servidas as mesmas preparações no almoço, jantar e ceia. Foi observado que o almoço, jantar e ceia geraram, respectivamente, 35,88 g, 44 g e 65,65 g por pessoa. O restaurante servia diariamente cerca de 720 refeições entre ceia, almoço e jantar durante duas semanas e os resultados podem ser vistos na Tabela 4 adaptada. Pode-se perceber que mesmo não se tratando de um grande restaurante industrial as sobras dos pratos tiveram um volume considerável em apenas duas semanas de pesquisa realizada.

Nonino-Borges et al. (2006) avaliaram os restos de alimentos da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto - SP/Brasil referentes a 14 dias de refeições distribuídas no almoço e jantar. Dos 402 kg de alimentos produzidos destinados a alimentação de pacientes e funcionários retornaram 123 kg de alimentos, cerca de 33%.

Em média o Restaurante Universitário da UFRRJ serve em torno de 4700 refeições por dia durante o período letivo. Destes, cerca de 2900 refeições são servidas no almoço, 1200 no jantar e 600 no desjejum. A quantidade de resíduos de alimentos gerados por dia varia em função do tipo de alimento, da quantidade de pessoas e da aceitabilidade do prato. Em média são gerados cerca de 132 kg de restos de alimentos por dia no almoço, 83kg no jantar e 5,6 kg no desjejum. Para o cálculo de resíduos gerados, foram levados em consideração os finais de semana, onde foram servidos uma quantidade menor de refeições em relação aos dias letivos do mês de novembro de 2012.

Tabela 3: Plantas pilotos de produção de etanol a partir de resíduos Agroindustriais e lixo urbano

Companhia	Local	Biomassa	Capacidade	Início
Iogen	Ottawa, Canadá	Cavaco de madeira	900 kg/dia	1985
Iogen	Ottawa, Canadá	Palha de trigo	900 kg/dia	1993
Masada/TVA	Muscle Shoals, EUA	Madeira	Não disponível	1993
SunOpta	Norval, Canadá	Vários (não-madeira)	900 kg/dia	1995
Arkenol	Orange, EUA	Vários	900 kg/dia	1995
Bioengineering Resources	Fayetteville	Madeira mole e casca de árvore	Não disponível	1998
NREL/DOE	Golen, EUA	Palha de milho, outros	900 kg/dia	2001
Pearson Technologies	Abardeen, EUA	Resíduos de madeira, palha de arroz	27 Mg/dia	2001
NEDO	Izumi, Japão	Cavaco de madeira	300 L/dia	2002
Dedini	Pirassununga, Brasil	Bagaço da cana	1600 m ³ /ano	2002
Tsukishima Kikai Co.	Ichikawa, Chiba, Japão	Resíduos da madeira	900 kg/dia	2003
Etek Ethanol Teknik	Ornskoldsvik, Suécia	Serragem de abeto	5000 L/dia	2004
Pure Vision	Ft. Lupton, EUA	Palha de milho, bagaço	90 kg/dia	2004
Universal Entech	Phoenix, EUA	Lixo municipal	100 L/dia	2004
Sicco A/S	Odense, Dinamarca	Palha de trigo	100 kg/h	2005
Abengoa Bioenergy	York, EUA	Palha de milho	2000 m ³ /ano	2006

Fonte: Gonçalves Filho, 2011; Solomon et al., 2007

Tabela 4: Quantidade de alimentos desperdiçados em um restaurante institucional de uma metalúrgica de Piracicaba

Semana	Ceia (kg)	Almoço (kg)	Jantar (kg)	Total da semana (kg)
1ª semana	17,13	34,76	26,26	78,16
2ª semana	11,81	25,53	27,07	53,15
Média total	14,47	30,14	26,66	65,65

Fonte: adaptado de Augustini et al. (2008)

Segundo Tanaka et al. (2008) o desperdício de alimentos no setor de produção industrial possui uma composição relativamente constantes, com possibilidade de reutilização. Porém os resíduos de alimentos provenientes do lixo doméstico não possuem grandes possibilidades de serem reutilizados porque a composição é variável.

3.2 Produção de Etanol Utilizando Processos Fermentativos

No Brasil o etanol produzido por fermentação possui a cana-de-açúcar com matéria-prima, altamente competitiva com o etanol produzido por outras matérias-primas convencionais.

Até 2005 o Brasil era o maior produtor mundial de etanol, mas devido ao interesse de outros países no uso de biocombustíveis como aditivo da gasolina os Estados Unidos teve um aumento da produção (GONÇALVES FILHO, 2011).

Para a safra de 2011/2012 foram processados cerca de 300,628 milhões de toneladas de cana e produzidos cerca de 23,687 bilhões de litros de etanol, 14,17% menor que a safra de 2010/2011 (CONAB, 2011). Para a safra de 2012/2013 a área de cultivo está estimada em 8567,2 mil hectares e para a produção de etanol serão esmagadas 302,2 milhões de toneladas de cana para a produção de 23,96 bilhões de litros de etanol, sendo 4,81% superior a taxa de produção de etanol da safra de 2011/2012 (CONAB, 2012).

O destino do etanol produzido no Brasil é em sua maior parte para uso carburante, ou seja, combustível, com cerca de 80% da produção destinada a esse fim, 5% são destinados à indústria alimentícia, cosmética e alcoolquímica e 15% são exportados (UNICA, 2007).

Para a produção de etanol por método fermentativo, os materiais utilizados podem ser classificados em três tipos principais. O primeiro consiste no uso de açúcares que podem ser convertidos diretamente em etanol, como por exemplo, açúcar refinado e melado de beterraba. Requer o uso de micro-organismos adequados, sendo considerada, portanto, uma tecnologia simples. Em segundo lugar, milho, trigo e outros grãos que requerem uma etapa de hidrólise, que pode ser enzimática ou química, para tornar os açúcares complexos em simples e diretamente fermentescíveis. É bem aceita pela indústria de álcool, porém poderia competir pela produção de alimentos. E por fim, os materiais celulósicos, que precisam ser convertidos em açúcares fermentescíveis por processos hidrolíticos e tem despertado o interesse em diversas pesquisas, devido ao fato de se constituírem em matéria-prima abundante, renovável e de baixo custo (MA et al., 2009).

Os resíduos de alimentos sacarificados consistem em uma mistura de açúcares e sua distribuição pode variar conforme a composição dos rejeitos alimentares (JEONG, KIM e LEE, 2012). A glicose constitui cerca de 61 a 72% do açúcar redutor presente nos resíduos de alimentos (JEONG et al. 2009, JIN et al., 2010 apud JEONG, KIM e LEE, 2012).

Shahsavarani et al. (2013) argumentaram que a não produção em escala industrial de etanol obtido a partir de matérias-primas celulósicas, se dá devido a falta de pré-tratamentos eficazes e ao baixo rendimento em elevadas temperaturas.

Este fato serviu de incentivo para muitas pesquisas que buscam as condições ideais para a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais e de alimentos, com intuito de encontrar as condições para a redução dos custos e com melhor conversão de biomassa, tornando o processo competitivo para outras fontes de combustíveis.

Virunanon et al. (2013) citaram que o preço da enzima e a recuperação do etanol a partir das baixas concentrações formadas no fermentador impede a aplicação em escala

industrial da produção de etanol a partir de fontes como resíduos lignocelulósicos e não reduz a dependência do combustível de origem fóssil.

3.3 Bioquímica da Fermentação Alcoólica

As leveduras produtoras de álcool realizam a fermentação alcoólica com o objetivo de obter energia química necessária à sobrevivência e o etanol produzido é um produto desse processo, sendo preciso o conhecimento das melhores condições para que os micro-organismos possam ter uma maior eficiência na produção de álcool (STECKELBERG, 2001).

A fermentação alcoólica é um processo de oxidação anaeróbica parcial da glicose, iniciando-se pela via glicolítica, com formação de duas moléculas de piruvato que posteriormente, em condições de anaerobiose, serão descarboxiladas pela ação de enzimas piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas de gás carbônico. O acetaldeído será reduzido a etanol (JAY, 2005). Em leveduras, a fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma e a respiração, oxidação total do açúcar, ocorre nas mitocôndrias (STECKELBERG, 2001).

A Figura 1 apresenta as reações que envolvem o processo de transformação da glicose em etanol.

Os micro-organismos que realizam a fermentação alcoólica convertem a glicose em etanol e CO₂. Na glicólise, a glicose é convertida a piruvato. Primeiramente o piruvato sofre a descarboxilação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase na presença de Mg²⁺. Em seguida, por uma reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase fornecendo o poder redutor (NELSON e COX, 2002).

Segundo Amaral (2009) o processo de conversão do açúcar em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequência ordenada, catalisada por uma enzima específica confinada no citoplasma celular, onde é realizada a fermentação alcoólica. Os carboidratos utilizados como fonte de substratos podem ser endógenos, ou seja, constituintes da levedura (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros) fornecidos à levedura.

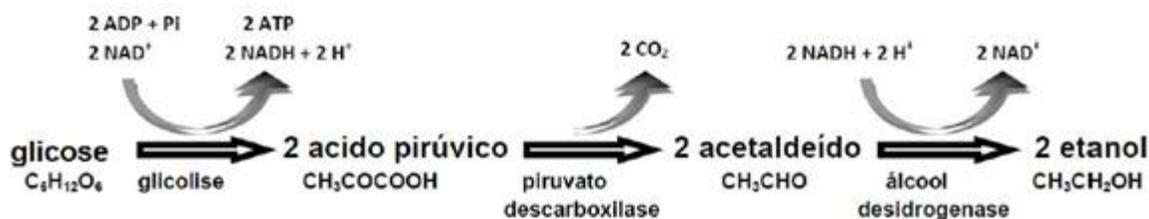


Figura 1: Transformação de glicose em etanol (Fonte: VALLE, 2012)

A equação de Gay-Lussac (Equação 1) faz um balanço das etapas de conversão da molécula de glicose a etanol, mas em presença de oxigênio haverá um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde será oxidado através da ação de enzimas a CO₂ e água (STECKELBERG, 2001).



Através da equação 1, pode-se perceber que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de CO₂ (88 g) e 57 kcal de energia. Portanto, o rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g/g (STECKELBERG, 2001). Em práticas industriais, o rendimento da fermentação alcoólica pode chegar entre 90 e 92% do rendimento estequiométrico se bem conduzida (PACHECO, 2010).

3.4 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica

Vários fatores podem afetar o rendimento da fermentação alcoólica, entre eles: físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (oxigenação, pH) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração de levedura, micro-organismos contaminantes) (LIMA et al., 2001 apud AMARAL, 2009).

Durante a etapa de fermentação alcoólica, a levedura pode estar exposta a diversos fatores estressantes, entre eles: contaminação bacteriana, elevado teor alcoólico, elevada temperatura e acidez do meio (BASSO, 1991 apud AMARAL, 2009).

Segundo Antonini (2004) além da escolha e da preparação do fermento, algumas condições devem ser mantidas durante o processo de produção para obter uma ótima produtividade de etanol a partir de açúcares fermentescíveis. O controle destas condições poderá estimular o crescimento de micro-organismos desejáveis, bem como inibir os prejudiciais ao processo de produção de álcool.

Na fermentação alcoólica as bactérias atuam como micro-organismos competidores com as leveduras, que poderão prejudicar o consumo do substrato contido no mosto, principalmente a sacarose, provocando perdas e transformação de produtos como ácidos orgânicos e dextranas, reduzindo ou inibindo a produção de álcool (ANTONINI, 2004).

A contaminação bacteriana na fermentação pode prejudicar todo o processo de fermentação e resultar em problemas, tais como: consumo de açúcar; formação de goma; floculação do fermento; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio; e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (RODRIGUES, DANTAS e FINZER, 2009).

A temperatura pode ser considerada um fator crítico em fermentações alcoólicas e influenciar no tempo de fermentação. Se a temperatura for abaixo de 26°C, a fermentação não se desenvolve e quanto maior for a temperatura, a possibilidade de problemas causados por micro-organismos contaminantes aumenta, além das leveduras ficarem mais sensíveis a toxicidade do etanol produzido (LIMA et al., 2001 apud AMARAL, 2009).

Para o ótimo de crescimento das leveduras, a temperatura é inferior a temperatura ótima para a produção de etanol (STECKELBERG, 2001). O rendimento alcoólico em faixas de 15-20°C é maior, porém o tempo é prolongado. Em temperatura em torno de 25-31°C, a taxa inicial de fermentação é maior. As leveduras *S. cerevisiae* utilizadas nas indústrias são resistentes a altas temperaturas, mas pode interferir na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol e pH baixo (AMARAL, 2009). A temperatura ótima de fermentação tende a diminuir quando a concentração de etanol no meio aumenta. O efeito inibidor do etanol está intimamente relacionado a temperatura da fermentação, sendo a melhor faixa de resistência ao etanol para cepas de *S. cerevisiae* está entre 13 a 27°C e 11% (v/v) de etanol, abaixo e acima desses valores a tolerância diminui (STECKELBERG, 2001).

Grandes concentrações de oxigênio inibem a fermentação alcoólica e em condições micro aeróbicas, podem aumentar a utilização do substrato e a tolerância da levedura ao etanol,

sem haver decréscimo significativo no rendimento em etanol por unidade de substrato consumido (STECKELBERG, 2001).

O pH ótimo de fermentação alcoólica está entre 4 e 5. Em meios mais ácidos, o rendimento em etanol é favorecido pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com inibição da produção de glicerol e da carga microbiana contaminante. Entretanto, em pH em torno de 5,8 a 5,9, a fermentação alcoólica se desenvolve melhor. Valores baixos de pH podem provocar a perda de nutrientes e aumentar a sensibilidade do micro-organismo ao etanol, a ácidos orgânicos e a SO₂ (AMARAL, 2009).

Segundo Steckelberg (2001) a concentração de etanol é uma das substâncias que inibem a fermentação alcoólica e este efeito ocorre devido a outros aspectos como: presença ou não de outros inibidores, composição do meio, pressão parcial em oxigênio, temperatura, natureza da cepa e condições de cultura.

3.5 Processos Hidrolíticos para Obtenção de Açúcares Fermentescíveis

Durante a fermentação alcoólica, os micro-organismos utilizam os açúcares diretamente fermentescíveis para a sua conversão em etanol, quando os carboidratos não se encontram na forma de monossacarídeos, torna-se necessário tratamento da matéria-prima através hidrólise química ou enzimática para torná-lo fermentescível.

A hidrólise de carboidratos pode sofrer influência de diversos fatores, como temperatura, pH, configuração anomérica do carbono (α ou β), forma e tamanho do anel. De acordo com o aumento de ligações intermoleculares a sensibilidade à hidrólise diminui (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Para a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais e de alimentos há três importantes processos de sacarificação e fermentação, a saber: a sacarificação e fermentação simultânea, a semi-sacarificação e fermentação simultânea (SHAHSAVARANI et al., 2013) e o processo sequencial de hidrólise e fermentação (VAVOURAKI et al., 2013). A sacarificação e fermentação simultânea consistem no uso de enzimas e de micro-organismos simultaneamente para que a matéria-prima hidrolisada possa ser em seguida fermentada. Já a semi-sacarificação e fermentação simultânea consistem no uso de uma pré-hidrólise ácida antes da hidrólise enzimática simultânea a fermentação (SHAHSAVARANI et al., 2013). A hidrólise e fermentação sequencial consistem no tratamento termoquímico com ácido antes da etapa da fermentação (VAVOURAKI et al., 2013).

Para Hamelinck et al. (2005 apud SEABRA, 2008), os pesquisadores ainda não chegaram a um senso comum sobre qual método seria o mais eficiente e poderia reduzir os custos de produção de etanol de segunda geração. Para uns pesquisadores o ideal seria diminuir o número de etapas no processo, enquanto que para outros o melhor seria buscar condições otimizadas em cada etapa, visto que cada uma possui um ótimo diferente.

Muitas pesquisas reportam ao processo de sacarificação e fermentação simultânea e ao processo de semi-sacarificação e fermentação simultânea de resíduos de alimentos, mas poucas pesquisas retratam o uso de ácidos diluídos para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de resíduos de alimentos e de resíduos agroindustriais.

Para um pré-tratamento eficaz os açúcares devem ser formados diretamente ou subsequente a hidrólise, evitar perda ou degradação de açúcares e limitar a formação de produtos inibidores e minimizar os custos. Tratamentos físicos, físico-químicos, químicos e

biológicos são os métodos principais e pode ser utilizada a combinação desses métodos (SARKAR et al., 2012).

Sarkar et al. (2012) relataram que o primeiro passo para a produção de etanol a partir de resíduos agrícolas é a moagem, pois reduz a cristalinidade da celulose e melhora a eficiência no processo *downstream*, porém partículas muito finas podem prejudicar etapas subsequentes como a de hidrólise enzimática.

Pré-tratamentos físico-químico que utilizam ácido sulfúrico diluído, vapor de água, amônia e hidróxido de cálcio estão entre as opções mais promissoras, mas não devem ser aplicados de forma genérica a todas matérias-primas. O método de pré-tratamento por explosão a vapor consiste no rápido aquecimento com vapor saturado, sem adição de ácido, onde a matéria-prima é mantida pressurizada por um período de tempo e logo em seguida sofre uma súbita descompressão do equipamento (CORAL, 2009).

O método de tratamento com lavagem com água quente, também conhecido como hidrotermólise ou aquasolv, consiste no contato da água pressurizada de 1 a 15 min entre 170 e 230°C em que serão rompidas as ligações hemiacetálicas dos carboidratos, com aproximadamente 40 a 60 % da biomassa é dissolvida no processo e removendo cerca de 4 a 22% de celulose (CORAL, 2009). Neste processo há pequenas taxas de degradação de açúcares e de formação de compostos inibitórios (SARKAR et al., 2012).

Nos tópicos seguintes serão apresentadas outras formas de tratamentos de resíduos lignocelulósicos e de alimentos, foco principal deste trabalho.

3.5.1 Hidrólise química

Para hidrólise ácida concentrada a matéria-prima deve ser previamente seca e com umidade inferior 10%, para que não ocorra a diluição do ácido, onde a hidrólise ocorre em uma única fase a temperaturas branda, em torno de 35°C e tempo de residência de 5 a 60 min e para que o uso seja economicamente viável, torna-se necessário a recuperação do ácido, após ocorrida a hidrólise (SIVERS e ZACCHI, 1996).

Para a hidrólise química por ácido diluído podem ser utilizados ácidos sulfúrico, nítrico ou clorídrico como agente hidrolíticos, onde a mistura de solução de ácido e biomassa podem ser aquecidas indiretamente no reator ou diretamente por injeção de vapor, que se assemelha com o pré-tratamento por explosão de vapor. Este processo requer grandes quantidades de água e energia, sendo uma dos que apresentam melhores rendimentos na produção de açúcares (CORAL, 2009).

O processo de hidrólise ácida diluída utiliza temperaturas e pressões mais elevadas com tempo de contato variando de segundos a minutos. E a hidrólise realizada com ácido concentrado as condições de temperatura e pressão são mais brandas, porém um longo tempo de reações é necessário (GRAF e KOEHLER, 2000 apud GONÇALVES FILHO, 2011).

Segundo Coral (2009) em processos hidrolíticos por ácido diluído não é possível atingir rendimentos de recuperação de açúcares superiores a 50% e que neste método de hidrólise ocorrem duas reações de primeira ordem consecutiva. Na primeira reação, a celulose é convertida em glicose e na segunda, os açúcares serão transformados em outras substâncias químicas. Ainda segundo este autor as mesmas condições que favorecem a primeira reação, possibilitam condições para que ocorra a segunda, como consequência ocorre a degradação das moléculas de açúcares e formação do furfural e outros produtos tóxicos ao desenvolvimento microbiano.

Em meio ácido, as ligações glicosídicas podem ser facilmente quebradas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). Na hidrólise ácida ocorre a despolimerização dos polissacarídeos. Nos resíduos lignocelulósicos resulta em oligossacarídeos e suas unidades repetitivas, como xilose, ácido acético e furfural para a hidrólise da hemicelulose e, como glicose e hidroximetilfurfural para a hidrólise da celulose (GOUVEIA, NASCIMENTO e SOUTO-MAIOR, 2009).

Cheng et al. (2008) estudaram a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) (1,25% p/p) e desintoxicação por eletrodialise. O bagaço de cana na proporção de 10% (p/p) foi submetido ao tratamento por H_2SO_4 1,25% em autoclave a 121°C por 2 h. Em seguida o hidrolisado foi filtrado e a parte sólida lavada com 20 mL de água quente a 60°C. O filtrado e o líquido de lavagem foram analisados em conjunto e levados para a próxima fase de hidrólise. E antes da etapa sequencial a concentração de H_2SO_4 foi determinada por titulação com NaOH com fenolftaleína como indicador, sendo reintegrada para manter as mesmas condições que a etapa anterior. A concentração de açúcares redutores aumentou de 28 g/L para 63,5 g/L utilizando dois estágios.

Eletrodialise é um processo de bio-separação eletroquímica em que membranas eletricamente carregadas e uma diferença no potencial elétrico aplicado para separar as espécies iônicas a partir de uma solução aquosa e de outros componentes não carregados que tem sido utilizados na desmineralização da água natural, dessalinização de soluções salinas e na separação de ácidos orgânicos, ácido acético, ácido láctico e seus sais, espera-se com esse tratamento que o meio obtido do hidrolisado seja desintoxicado de produtos formados pela hidrólise ácida e também para o reciclo de ácido (CHENG et al., 2008).

Gong et al. (2010) desenvolveram um processo integrado de pré-tratamento integrado de hidrólise ácida e com posterior uso de solventes orgânicos (água/etanol) para fracionar a celulose, hemicelulose e a lignina de capim. Este método consistiu no tratamento com H_2SO_4 diluído para obter mais xilose que ficou concentrada na parte líquida. A parte sólida foi tratada com água/etanol, para que se obtivesse mais lignina, para ser posteriormente hidrólise por celulase e depois fermentada. As condições otimizadas foram 155°C por 7 min, com 0,8% de H_2SO_4 , obtendo 79,82% de glicose e de 98,77% de xilose. Posteriormente, em um segundo estágio foi realizado outro tratamento, obtendo-se rendimentos de 62% de glicose e removendo cerca de 99% de xilose e 80% de lignina nas condições ótimas de 195°C por 20 min, em 45% de etanol (v/v) com NaOH 0,4%. Depois da hidrólise enzimática, o rendimento de glicose foi de 92,6%.

Oberoi et al. (2010) avaliaram a produção de etanol a partir de cascas de laranjas utilizando dois estágios de hidrólise ácida e posterior fermentação. Para o primeiro estágio foram testadas as concentrações de H_2SO_4 de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1% (p/v), a 121°C, 15 psi por 15 min. Concentrações superiores a 0,5% apresentaram maior produção de hidroximetilfurfural e redução de açúcar. Para o segundo estágio, a biomassa pré-tratada no primeiro estágio foi submetida às mesmas condições de concentração de ácido, temperatura e pressão, com o tempo de 30 min. O melhor concentração de glicose na primeira etapa de hidrólise foi 50,8 g/L obtida com o tratamento com H_2SO_4 0,5% (p/v). Para a segunda etapa de hidrólise, a melhor concentração de açúcares redutores de 29,65 g/L foi obtida com tratamento com a concentração de H_2SO_4 0,75% (p/v).

Vavouraki et al. (2013) utilizaram diferentes diluições (0,7%, 1,5% e 3%) para os ácidos HCl e H_2SO_4 para testar a hidrólise de resíduos de alimentos. A melhor concentração de glicose de 509 mg/g de resíduo seco foi obtida por H_2SO_4 3%, a 100°C, por 30 min, que por sua vez foi menor que a concentração de glicose de 539 mg/g de resíduo seco obtida nas condições de HCl 1,5%, a 120°C por 120 min.

3.5.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática possibilita muitas vantagens em relação aos processos hidrolíticos por ácido concentrado e ácido diluído, pois atingem altos rendimentos de produção de açúcares, superiores a 0,85 g/g de celulose, ocorrem em temperaturas brandas (40-50°C) e pressão atmosférica. Porém a elevada duração do processo, em torno de 48 a 72 h, dificulta essa prática bem como problemas operacionais como a desativação catalítica por inibição das atividades da enzima e do elevado custo (CORAL, 2009).

Para a utilização de hidrólise enzimática durante a produção de etanol existem dois processos. A sacarificação e fermentação separadas, onde cada etapa pode ter diferentes temperaturas, uma ideal para a enzima e outra ideal para o micro-organismo. E a sacarificação e fermentação simultâneas, onde o açúcar obtido deve ser rapidamente convertido a etanol (KIM et al., 2011).

O processo de sacarificação e fermentação simultânea possibilita uma série de vantagens e possui alguns pontos considerados inconvenientes. A vantagem é que a glicose é convertida de forma contínua a etanol, o que possibilita que uma quantidade menor de enzimas sejam necessárias por grama de celulose, o que pode reduzir os custos com a produção enzimática. Como desvantagem é que sem uma etapa de pré-tratamento para a deslignificação pode dificultar a separação do fermento e da lignina (SIVERS e ZACCHI, 1996).

Ratnam et al. (2003) avaliaram os efeitos da temperatura, do pH e do tempo de fermentação no processo simultâneo de sacarificação e fermentação para a produção de etanol a partir de sagu, utilizando a enzima amiloglicosidase e a bactéria *Zymomonas mobilis* ZM 4. A máxima concentração de etanol foi de 70,68 g/L, obtida de 140 g/L de amido de sagu, com rendimento de 97,08% em condições ótimas de temperatura (36,74°C), pH (5,02) e tempo de fermentação (17 h).

Bandaru et al (2006) através da metodologia da superfície de resposta, estudaram as condições de sacarificação e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir do amido de sagu com a enzima amiloglicosidase co-imobilizada e a bactéria ácido tolerante *Zymomonas mobilis* MTCC 92, por fermentação submersa. A máxima concentração de etanol foi de 55,3 g/L obtida com uma concentração de 150 g/L de amido de sagu. As condições ótimas foram 32,4°C, pH 4,93 e tempo de fermentação de 17,24 h.

Sriroth et al. (2000) investigaram a hidrólise enzimática de resíduos da mandioca, utilizando as enzimas celulase e pectinase. Os resultados demonstraram que o uso das enzimas separadamente não foi eficiente para melhorar a extração do amido. Para a recuperação de amido, a concentração de celulase possui uma maior eficiência quando em presença de pectinase. O tratamento da polpa da mandioca com 15 unidades de celulase e 122,5 unidades de poligalacturonase (PG) por g de polpa seca por 60 min recuperou 40% de amido. Este amido recuperado é menos suscetível a α -amilase que o amido obtido de forma convencional.

Krishna e Chowdary (2000) otimizaram o processo de sacarificação e fermentação simultâneos de folhas de *Antigonum leptopus*, utilizando pré-tratamento alcalino, enzimas celulases produzidas por *Trichoderma reesei*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo produtor. As condições ótimas das enzimas foram de 100 U/g de substrato,

15% (p/v) a 38,5°C por 57,2 h. Nestas condições o rendimento de etanol previsto pelo modelo foi de 3,02% (v/v) e experimental de 3,0% (v/v).

Moon et al. (2009) estudaram a hidrólise de resíduos alimentares, a fermentação batelada e o efeito do sal presente nos alimentos sobre a fermentação e a produtividade do etanol. Foram utilizadas as enzimas amiloglicosidase e carboidrases separadamente e a mistura dessas duas enzimas. O máximo rendimento de glicose foi de 0,46 g/g de resíduo seco para os rejeitos tratados com as duas enzimas, 0,41 g/g para os tratados somente com amiloglicosidase e 0,35 g/g para os tratados com carboidrases. As condições que obtiveram o melhor rendimento de etanol de 0,23 g/g de resíduo foram após tempo de 15 h de fermentação por *S. cerevisiae* KCTC 7107. Quanto ao sal de cozinha, foi verificado que até uma concentração de 3% não houve nenhuma interferência sobre a fermentação e a partir de 4% a absorção de substrato e o crescimento das células de levedura diminuíram significativamente.

Nadir et al. (2009) estudaram a hidrólise enzimática de sorgo doce e mandioca para a produção de etanol. As enzimas utilizadas foram a α -amilase e amiloglicosidase. O microorganismo utilizado foi a *S. cerevisiae* na forma seca industrial e a fermentação em biorreator de 2 L (*B-Braun*). A quantidade de glicose obtida após o processo de hidrólise foi maior no sorgo doce do que na mandioca, sendo 50,07 e 40 g/L, respectivamente.

Yan et al. (2011) utilizaram resíduos de alimentos como substrato para a obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol. A máxima concentração de açúcares redutores de 164,8 g/L foi obtida com a concentração de enzima amiloglicosidase 142,2 U/g, pH sacarificação 4,82, temperatura de reação de 55°C por 2,48 h.

Oberoi et al. (2011) utilizaram resíduos de tangerina kinnow para a sacarificação e fermentação simultânea. As condições ótimas foram de 6 FPU de celulase/g_{resíduo}, 60 FPU de pectinase/g_{resíduo} a 37°C por 12 h em frascos Erlenmeyer. A concentração de etanol obtida foi de 42 g/L e a produtividade de 3,5 g/L.h.

3.5.3 Hidrólise química e enzimática combinadas

Devido a não disponibilidade de açúcares possíveis de hidrólise enzimática em função da íntima associação com a lignina na parede celular dos vegetais é necessário um pré-tratamento para tornar possível a hidrólise enzimática e posterior fermentação (EL-ZAWAWY et al., 2011). Por motivos econômicos, tratamentos termo químicos como o uso de explosão à vapor e hidrólise ácida diluída são empregados para preparar o material lignocelulósico para hidrólise enzimática, solubilização dos componentes da hemicelulose e aumentar o acesso a celulose (EL-ZAWAWY et al., 2011).

Grohmann, Cameron e Buslig (1995) pesquisaram a solubilização e despolimerização de carboidratos no tratamento de cascas de laranja com H₂SO₄ (0,06 e 0,5%) a 100, 120 e 140°C. Os resultados demonstraram que apenas açúcares solúveis e açúcares derivados da hidrólise da hemicelulose foram eficientemente liberados pela hidrólise com ácido a quente, os segmentos de pectina contendo unidades de ácido galacturônico foram resistentes a hidrólise com H₂SO₄. O tratamento com ácido obteve efeito positivo sobre a taxa de hidrólise enzimática subsequente, com uma mistura de enzimas celulolíticas e pectinolíticas.

Saha e Bothast (1999) avaliaram o pré-tratamento com uso de água quente, álcali e ácido diluído para posterior etapa de sacarificação enzimática para a produção de etanol a partir da fibra do milho. O pré-tratamento com água quente a 121°C por 1 h e o pré-tratamento com álcali sob as mesmas condições facilitaram a posterior hidrólise enzimática do amido e da

celulose, porém não alcançaram os mesmos resultados na fração hemicelulose para ambos os pré-tratamentos. Os componentes da hemicelulose e amido foram convertidos a açúcares monoméricos através do uso de H_2SO_4 (0,5-1,0% v/v) a 121°C . O melhor método de pré-tratamento e posterior sacarificação enzimática ocorreu nas condições de 15% sólido (v/v), 0,5% H_2SO_4 a 121°C por 1 h e neutralização para a etapa de sacarificação enzimática a pH 5,0 e utilização das enzimas celulase e β -glicosidase. O rendimento da sacarificação foi de 85-100% do rendimento teórico.

Curreli et al. (2002) estudaram o processo de hidrólise da palha de trigo em duas etapas, primeiramente tratamento com H_2SO_4 2% a 90°C em tempo que variou de 2 a 24 h, seguido pelo tratamento alcalino com NaOH 1% sob agitação em tempo que variou de 6 a 24 h. As frações de hemicelulose foram hidrolisadas com H_2SO_4 2% a 90°C , que permitiu a recuperação da xilose cristalina e o processo de solubilização alcalina sem presença de sulfitos ou cloro removeram a lignina.

Moxley et al. (2008) investigaram a liberação dos açúcares presentes em material lignocelulósico e celulósico de talo de cânhamo. Foram investigadas as condições de concentração de ácido, temperatura e tempo de reação e a combinação com a hidrólise enzimática para máxima liberação de açúcar. O melhor resultado foi obtido nas condições de 84,0% de H_3PO_4 a 50°C , por 60 min. A digestibilidade do glucano foi de 96% em 24 h utilizando uma concentração enzimática de 15 unidades em papel filtro de celulase por grama de glucano.

Cekmecelioglu e Uncu (2013) investigaram o pré-tratamento com água quente e com H_2SO_4 1% e 4% (p/v) seguidos de hidrólise enzimática por α -amilase, amiloglicosidase e β -glicosidase para a hidrólise de resíduos de cozinha para obtenção de açúcares redutores para a produção de etanol. A melhor concentração de glicose de 64,8 g/L foi obtida com o pré-tratamento com água quente a 60°C , indicando que para a redução dos custos de hidrólise do lixo de cozinha o uso do ácido pode ser retirado.

3.6 Micro-organismos Utilizados Para a Produção de Etanol

Para que a fermentação alcoólica ocorra sem ocasionar produtos secundários indesejáveis e para maximizar a produção de álcool é necessário tomar alguns cuidados, tais como, conhecer as características dos micro-organismos a serem utilizados e da matéria-prima a ser tratada, para que se tenha controle de todo o processo.

As leveduras são agentes biológicos responsáveis pela transformação bioquímica do açúcar em etanol, portanto são de fundamental importância para que se tenha um bom desempenho em fermentação alcoólica. Quanto às exigências nutricionais, este grupo está entre aquele que se desenvolve em substratos mais simples, composto de fontes de carbono e minerais e os que se desenvolvem em meios mais complexos (PACHECO, 2010).

Para fermentação alcoólica, é importante a escolha por linhagens de micro-organismos que devam atender os seguintes requisitos: velocidade de fermentação, com elevada transformação de açúcar em álcool por unidade de tempo e massa de levedura; resistência a altas concentrações de álcool; eficiência de conversão de açúcar em álcool; resistência ao pH; estabilidade genética, as propriedades mencionadas acima devem ser mantidas nas gerações subsequentes da linhagem genitora (PACHECO, 2010).

Nos processos para utilização da celulose como fonte de nutrientes, tem sido proposto um micro-organismo que combine em um único processo a produção de enzima, a sacarificação da celulose e fermentação, que vise à redução dos custos (LYND et al., 2008 apud TSAI et al., 2009).

Para Tsai et al. (2009) um micro-organismo promissor para a produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*, pois são resistentes a concentração de álcool. Estes autores ressaltam que devido às limitações energéticas sob condições de anaerobiose, apenas uma pequena quantidade de celulase é segregada e uma alternativa para melhorar a hidrólise é inserir enzimas celulolíticas sobre a levedura, formando celulosomas. O componente principal deste complexo é um *scaffoldin*, estrutura que consiste em pelo menos uma ligação de celulose e de coesina, que são encaixados individualmente com uma celulase diferente etiquetado com domínio *dockerin* correspondente. Segundo Xu e Smith (2010) *scaffoldin* compreende uma variedade de enzimas, celulase e hemicelulases, por exemplo, organizadas em torno de uma proteína de integração não catalítica. E segundo Ferreira (2011) coesina é um complexo melhor conhecido em leveduras e mamíferos, que é formado por duas proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos e duas proteínas de coesão das cromátides irmãs.

A associação de enzimas com especificidades complementares, sobre a superfície das células dos micro-organismos, provoca aumento na sinergia e faz com que o micro-organismo seja capaz de utilizar os polissacarídeos gerados pelas enzimas celulolíticas (LU et al., 2006 apud XU e SMITH, 2010).

Muitas bactérias anaeróbias podem desenvolver um complexo enzimático, chamado de celulosoma, na superfície da célula para maximizar a catálise da celulose com apenas uma quantidade limitada de enzimas (DEMAIN, NEWCOMB e WU, 2005; DOI e KOSUGI, 2004 apud TSAI et al., 2009).

Fujita et al. (2004) produziram um biocatalisador com um complexo de três espécies de enzimas celulolíticas na superfície da célula de *S. cerevisiae*. A cepa da levedura com acréscimo do complexo enzimático apresentou maior capacidade de hidrolisar celulose amorfa, permitindo um rendimento de 0,45 g/g de produção de etanol, o que sugere que esta cepa pode fermentar diretamente este tipo de substrato.

Tsai et al. (2009) demonstraram a montagem de um minicelulosoma em superfícies de células de *S. cerevisiae*, composta por três celulasas e a viabilidade deste micro-organismo para a produção de etanol a partir de materiais celulósicos. A concentração de etanol final foi de 3,5 g/L, 2,6 vezes mais elevada do que a obtida usando a mesma quantidade de celulase isolada.

Uma forma de maximizar o processo de produção de etanol a partir de fontes compostas por pentoses e hexoses é utilização de co-cultura de micro-organismos, ou seja, o emprego de dois micro-organismos para a fermentação dos açúcares disponíveis em um meio de cultura. A co-cultura permite que açúcares não fermentados por um determinado micro-organismo possa ser convertido a etanol por outro micro-organismo (JEONG, KIM e LEE, 2012).

As co-fermentações podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizadas para utilização das pentoses e das hexoses. A utilização de hidrolisados lignocelulósicos para a produção de etanol requer a presença de micro-organismos que fermentem as hexoses (glicose, manose e galactose) e as pentoses (xilose e arabionose) na presença de compostos inibitórios como furaldeídos e fenóis (PEREIRA, 2010).

Substratos a base de celulose, como por exemplo, resíduos de legumes, frutas e hortaliças, são efetivamente hidrolisados e fermentados, obtendo-se elevada concentração de

etanol. Neste tipo de matéria-prima há a presença de xilose que não pode ser convertida a etanol através do emprego da levedura *Saccharomyces*. O que torna necessário o emprego de outros fungos, como a *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolin tannophilus*, que podem fermentar xilose diretamente a etanol, porém baixa concentração de etanol é obtida (SCHNEIDER et al., 1981, SLININGER et al., 1982 apud JEONG, KIM e LEE, 2012).

Os gêneros *Candida* e *Pichia* estão entre os micro-organismos mais promissores para a conversão da xilose em etanol, porém não são tolerantes a altas concentrações de etanol, o que não torna viável a utilização. Há estudos com algumas bactérias que são tolerantes a altas concentrações de etanol, porém realizam fermentação mista e como produto final haverá uma variedade de compostos formados (MORAES et al., 2013). A *Picchia stipitis* possui taxa de conversão de 0,3 a 0,44 g/g de substrato (PEREIRA, 2010).

Segundo Pereira (2010) quando a concentração de xilose chega a um determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns micro-organismos podem preferir utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, como é o caso da *Picchia tannophilus*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*.

P. stipitis e *P. tannophilus* podem alcançar a produção de 5,4% (p/v) de etanol em altas concentrações de açúcares, porém a produtividade do etanol a partir xilose pode chegar a 10% das concentrações obtidas por *S. cerevisiae*, enquanto que *S. cerevisiae* produtividade específica é de 1,89 g/h a de *P. stipitis* é de 0,20 g/h (FERNANDES, 2008)

Preez, Bosch e Prior (1986) estudaram os efeitos da temperatura, do pH e da concentração de xilose na fermentação por *Candida shehatea* e *Pichia stipitis*. As condições ótimas foram pH entre 4 e 5,5, temperatura 30°C e de 50 g/L de xilose. A produtividade máxima de etanol foi de 0,9 g/L.h, obtida com ambas as leveduras. O rendimento da produção de etanol por *C. shehatea* diminuiu em temperaturas acima de 30°C e quando a concentração de xilose era alta, produzindo xilitol. Para *P. stipitis* a produção de xilitol foi a partir da temperatura de 36°C.

Steckelberg (2001) argumenta que em escala industrial, as leveduras do gênero *Saccharomyces* são micro-organismos mais utilizados, pois apresentam características favoráveis para transformar açúcares em etanol.

Este fato possibilita a seleção de cepas industriais com características adquiridas que as tornam produtores superiores, mais tolerantes aos produtos formados na fermentação (AMARAL, 2009).

Há pesquisas que buscam a produção de etanol por outros micro-organismos, incluindo outras espécies de leveduras, como a *Picchia stipitis* e *Candida shehatea* e bactérias, como *Zymomonas*, *Escherichia coli* com gene de *Zymomonas mobilis*. As leveduras são organismos eucarióticos e as *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas para a produção de etanol, apresentam-se na forma unicelular com 2 a 8 micrômetros de diâmetro (STECKELBERG, 2001).

Bactérias *Zymomonas mobilis* possuem grande potencial para a fermentação alcoólica onde a produção pode chegar a 1,9 mol de etanol para cada mol de glicose, com velocidade de três a quatro vezes superior que a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009).

As condições ideais para o crescimento da *Z. mobilis* estão nas faixas de temperatura de 30 a 36°C e de pH 5 a 7. Quando cultivadas em meio complexo, 98 % da glicose podem ser convertidas em etanol, CO₂, lactato e outros, com apenas 2% da glicose utilizada para o crescimento da biomassa (ERNANDES, 2009).

Z. mobilis apresenta diversas vantagens em relação a utilização de leveduras, como: fermentações mais rápidas com maior rendimento em etanol, condições de crescimento mais simples, maior tolerância a elevadas temperatura e a elevadas concentrações de açúcar e álcool. Porém o rendimento do processo fermentativo do etanol diminui quando se usa sacarose como matéria-prima, devido a transformação em levana e sorbitol (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009).

3.7 Substratos e Processos Fermentativos Utilizados na Produção de Etanol

3.7.1 Produção de etanol a partir de resíduos da agroindústria de alimentos

Bringhenti e Cabello (2005) avaliaram a utilização dos resíduos da industrialização da mandioca como fonte de biomassa, para a produção de álcool destinado à indústria alimentícia. O amido foi hidrolisado por α -amilase e após a fermentação por *S. cerevisiae* foi separado e analisado. A concentração de etanol obtida foi de 97,64 mL/L_{mosto}.

Negro et al. (2006) estudaram a utilização de hastes de alcachofra de Jerusalém para a extração de açúcares para a fermentação e produção de etanol por *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. Foram estudados os efeitos da proporção sólido/líquido, temperatura e adição de ácido para obter um substrato rico em frutose fermentescível. A máxima extração de glicose alcançada foi de 35 g/L obtida utilizando uma proporção de 1:6. Para a levedura *Kluyveromyces marxianus* foi necessário acréscimo de 30 h para alcançar os resultados obtidos com a utilização de *S. cerevisiae* com cerca de 8 e 9 h.

Sharma et al. (2007) estudaram a concentração de inóculo, temperatura, tempo de incubação e tempo de agitação para a produção de etanol a partir de resíduos de *kinnow* e da casca da banana pelo processo simultâneo de sacarificação e fermentação. Foram utilizadas a enzima celulase e co-cultura de *S. cerevisiae* G e *Pachysolen tannophilus* MTCC 1077. Os resíduos de *kinnow* e da casca da banana foram pré-tratados a vapor e utilizados como substrato na proporção de 4:6 (*kinnow*: casca de banana). As condições ótimas encontradas foram de 30°C, inóculo *S. cerevisiae* G 6% (v/v), inóculo *P. tannophilus* a 4% (v/v), em 48 h de incubação e agitação durante as primeiras 24 h. A máxima concentração de glicose foi 63 g/L e concentração de etanol de 26,84 g/L.

Wilkins et al. (2007) estudaram os efeitos da produção de etanol por *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 12708, a partir dos resíduos da casca de laranja Valência com adição do óleo da casca. Para a hidrólise foram utilizadas as enzimas celulase, pectinase e β -glicosidase e a fermentação ocorreu a 37°C, 130 rpm por 72 h. A máxima concentração de etanol obtida foi de 37,1 e 40,9 g/L para *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

Gouvea et al. (2009) avaliaram a produção de etanol a partir de cascas de café. Foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* em fermentação batelada, cascas de café inteiras, moídas e em extrato aquoso. Observou-se que o rendimento da fermentação diminuiu com o aumento da quantidade de levedura. Os melhores resultados foram obtidos nas condições ótimas de casca de café inteira, 3 g de levedura/L de substrato a 30°C. A produção de etanol chegou a 8,49 \pm 0,29 g/100 g de base seca (13,6 \pm 0,5 g_{etanol}/L).

Santos et al. (2010) através do planejamento experimental avaliaram as condições de sacarificação e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço da cana de açúcar, utilizando a bactéria ácido tolerante *Zymomonas mobilis*. Foram avaliados o teor de sólidos, a carga enzimática e a concentração celular. As condições ótimas encontradas foram de

30% de teor de sólidos, carga enzimática de 25 unidades em papel filtro de celulase por grama e a concentração celular de 4 g/L, que resultaram em 60 g/L de etanol, representando uma produtividade de 1,5 g/L.h.

Vaheed, Shojaosadati e Galip (2011) investigaram a produção de etanol a partir do extrato da vagem da alfarroba por *Zymomonas mobilis* PTCC 1718. A quantidade de etanol produzida a partir do extrato hidrolisado com H₂SO₄ e não hidrolisado não foram significativamente diferentes, evidenciando que não é necessário o tratamento de hidrólise antes da fermentação. A quantidade máxima de etanol obtida foi de 0,34 ± 0,02 g/g de matéria-prima a 30°C, pH inicial de 5,2, 80 rpm e nas concentrações de inóculo 0,017 g, açúcar inicial 5,17 g, peptona 0,43 g e extrato de levedura 0,43 g por 36 h.

Li, Chen e Zhu (2011) estudaram a produção de etanol a partir de resíduos da polpa da mandioca. Foram utilizadas as monoculturas das bactérias *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, e a co-cultura destes dois micro-organismos a uma temperatura de 55°C por 96 h. A concentração residual de glicose no caldo de fermentação foi de 11,96 g/L para a monocultura de *C. thermocellum*, de 8,02 g/L com *T. saccharolyticum* e de 13,06 g/L para a co-cultura. Em seguida, foi inoculada a levedura *S. cerevisiae* no caldo de fermentação a 37°C por 24 h, sem qualquer adição de nutrientes. A concentração de etanol foi de 8,67 g/L, representou aumento de 21,43% e 25,83% quando comparado com o resultado obtido com *C. thermocellum* e *T. saccharolyticum*, respectivamente. Através do uso de co-culturas é possível a produção de etanol a partir de resíduos da polpa da mandioca sem qualquer tratamento complementar como hidrólise ácida ou enzimática.

Ha et al. (2012) utilizaram resíduos da produção da cerveja diluídos com água para a produção de etanol. Para a etapa de fermentação foram utilizados, frascos Erlenmeyer 50 mL em condições estáticas. Os resultados demonstraram que houve aumento na produção de etanol para as condições de até 2 h de fermentação, tempo de estoque dos resíduos de até 7 dias, utilizando 20% (v/v) do sedimento em água destilada, sem quaisquer adição de nutrientes ou enzimas. Os resultados mostraram aumento de 2,09% de produção de etanol depois de 2 h de fermentação, com resíduos armazenados por 1 dia. E aumento de 3,25% para os sedimentos com tempo de estoque de 3 dias. Foi verificada atividade residual de enzimas hidrolíticas no substrato a 60°C.

3.7.2 Produção de etanol a partir de resíduos de alimentos

Kim et al (2008) utilizaram a metodologia da superfície de resposta para otimizar as condições de sacarificação enzimática e fermentação alcóolica para a produção de etanol a partir de resíduos de alimentos obtidos de uma cafeteria da *Chosun University*. Para tal foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* e a enzima comercial *Spirizyme Plus FG* (*Aspergillus niger* amiloglicosidase). Os melhores resultados para a etapa de sacarificação foram de pH 5,2, temperatura de reação 46,3°C e concentração de enzima 0,16 (v/v). Para a etapa de fermentação as condições ótimas encontradas foram pH 6,85, temperatura de 35,3°C e tempo de 14 h. A maior quantidade de etanol produzida foi de 57,5 g/L.

Tang et al (2008) estudaram a produção de etanol a partir de rejeitos alimentares obtidos do refeitório da Universidade de Kumamoto, no Japão. Os resíduos foram previamente tratados com bactérias ácido-láticas para preservar o frescor dos alimentos. Para a sacarificação foi utilizada neste estudo a enzima amiloglicosidase e levedura flocculante *S. cerevisiae* KF-7,

durante a fermentação. Os resultados obtidos mostraram que a partir de 1 kg de resíduos foram obtidos 30,9 g de etanol.

Wang et al (2008) utilizaram a metodologia da superfície de resposta para otimizar as condições do processo simultâneo de sacarificação e fermentação para produção de etanol a partir do lixo de cozinha, utilizando a enzima amiloglicosidase e a levedura *S. cerevisiae*. Fermentações fechadas e abertas foram feitas sem tratamento térmico para avaliar os efeitos sobre a produção de etanol. Na fermentação aberta sem tratamento térmico foram obtidos os melhores resultados, devido ao fato dos nutrientes permanecerem intactos e a concentração máxima de etanol foi de 33,05 g/L obtida nas condições ótimas de tempo 67,6 h, pH de 4,18 e temperatura de 35°C. A produção de etanol chegou a 0,23 g_{etanol}/g_{lixo seco}.

Ma et al (2009) utilizaram resíduos de alimentos obtidos do Restaurante Universitário número 2 da Universidade de Ciência e Tecnologia da China, para a produção de etanol utilizando bactéria ácido-tolerante. A *Zymomonas mobilis* GZNS1 foi inoculada a uma concentração de 10% (v/v) e adicionada em meio de cultura em conjunto com as enzimas amiloglicosidase e protease em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL do meio, a 30°C por 48 h. Os melhores resultados foram de 46 e 52 g/L de etanol produzido.

Su et al. (2010) pesquisaram a viabilidade da produção de biodiesel e etanol a partir de resíduos de cozinha. Foi feito o processo de separação entre o óleo e a parte sólida. Para a produção de biodiesel, a partir do óleo separado do resíduo alimentar, foi utilizado H₂SO₄ para retirar fosfolipídios, NaOH para eliminar ácidos graxos e argila ativada a 5% de dosagem (massa de argila/massa de óleo) a 100°C. As análises químicas demonstraram que o biodiesel obtido é semelhante ao produzido com matérias primas convencionais. Para a produção de etanol foi utilizada a parte sólida dos resíduos de alimentos. Foram adicionadas as enzimas amiloglicosidase (100 U/g de resíduo úmido) e protease (100 U/g de peso úmido), a levedura seca foi utilizada a 0,1% (g/g de massa úmida). A fermentação foi conduzida em frasco Erlenmeyer 250 mL contendo 150 mL do meio. A máxima concentração de etanol obtida foi de 44 g/L a 35°C por 72 h.

Wei et al (2010) avaliaram a produção de biodiesel e etanol a partir de resíduos de alimentos. Através de processo de separação, o óleo e o componente sólido rudimentar de resíduos alimentares foram obtidos. A síntese química foi utilizada para a produção de biodiesel a partir do óleo e a fermentação, por levedura seca (*Anqi Yeast Company*) foi escolhida para a produção de etanol a partir de partes sólidas, com as quais foram obtidos 44 g_{etanol}/L. Estes autores concluíram que etanol e biodiesel a partir de resíduos de produção de alimentos poderiam, em grande parte, economizar o custo de produção, bem como resolver o problema da poluição.

Yan et al. (2011b) estudaram a produção de etanol a partir de alimentos coletados no refeitório do Instituto de Física dos Plasmas da Academia Chinesa de Física. O procedimento foi realizado em reator com células de *S. cerevisiae* H058 imobilizadas com esferas de alginato de cálcio a 30°C e pH 5,0. As enzimas utilizadas foram a amiloglicosidase e α -amilase. A máxima concentração de etanol de 89,28 g/L foi obtida com 5,87 h de retenção hidráulica. Em um tempo de retenção hidráulica de 1,47 h, a máxima concentração foi de 49,88 g/L.h com rendimento de 0,48 g/g.

Jeong, Kim e Lee (2012) estudaram a co-fermentação de resíduos de alimentos sacarificados, com o uso *Saccharomyces coreanus* (*S. cerevisiae* mutante) e *Pichia stipitis*. Na fermentação com *S. coreanus* em condições anaeróbias foram obtidos os melhores resultados de 9,09 g/L de açúcares redutores, 1,88 g/L de glicose remanescentes, 40,59 g/L de etanol e produtividade de 1,69 g/L.h. Para a fermentação com *P. stipitis*, os açúcares redutores foram

reduzidos rapidamente com produção de etanol menor que as obtidas nas condições aeróbicas e anaeróbicas de *S. coreanus*. A fermentação usando as duas leveduras foram realizadas por 24 h, 30°C, 100 rpm, infusão a 0,2% (v/v) de *S. coreanus* e 0,5-10% *P. stipitis*. A concentração e a produtividade final de etanol foram de 48,63 g/L e 2,03 g/L.h, respectivamente.

Jeong, Kim e Lee (2012) ao avaliarem a produção de etanol a partir de resíduos de alimentares utilizando co-cultura de *Saccharomyces coreanus* e de *Pichia stipitis*, observaram que para uma elevada produção de etanol, a fermentação deve ser induzida, primeiramente, até o meio da fermentação por *S. coreanus* e o açúcar não convertido por esse micro-organismo poderia ser convertido por *P. stipitis* na parte final do processo de fermentação.

Man et al. (2011) otimizaram o processo de produção de etanol a partir de chorume de resíduos de alimentos. Para fermentar foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* KCTC – 7904 e estudados os efeitos da temperatura (30-40°C), pH (4-6) e concentração de açúcares redutores (45-75 g/L) sobre o rendimento de etanol. A máxima concentração de etanol obtida foi de 23,56 g/L, rendimento de 0,31 g_{etanol}/g_{açúcares redutores} sob as condições ótimas de temperatura 40°C, pH 4,0 e de 75 g/L de concentração de açúcares redutores. Entre as variáveis, a temperatura e a concentração de açúcar tiveram um efeito sinérgico, enquanto que, para o pH os efeitos foram mínimos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Preparo dos Resíduos do Restaurante Universitário

Para a realização dos ensaios foram coletados rejeitos de alimentos dos pratos, no Restaurante Universitário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica – RJ, Brasil.

As coletas das amostras foram feitas por cinco dias sequenciais, devido aos pratos serem oferecidos com base em um cardápio balanceado, a fim de obter uma média da composição centesimal destes resíduos, quanto ao teor de proteínas, lipídios, cinzas, umidade, carboidrato e açúcares redutores.

Os resíduos, incluindo grãos, frutas, verduras, legumes, carnes e peixes, foram pesados, adicionada água destilada e triturados em liquidificador na proporção de 1:1 (p/v), ou seja, 500 g de resíduo para 500 mL de água destilada, para serem usados para as etapas de hidrólise e fermentação.

Para a caracterização centesimal, foram triturados em liquidificador sem adição de água destilada 500 g de resíduo e retiradas as alíquotas para a determinação de açúcares totais, lipídios, proteínas, cinzas e umidade.

Para que todos os ensaios do fatorial fracionado fossem realizados com a mesma amostra, um grande volume de amostra foi hidrolisado e depois de centrifugados, foram homogeneizados, distribuídos em recipientes e congelados.

4.2 Micro-Organismo e Obtenção de Inóculo.

Para o preparo do inóculo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, obtido junto a coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas – SP) disponível no Laboratório de Fermentações do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) do Instituto de Tecnologia (IT) da UFRRJ. A manutenção da cepa foi feita através de ágar inclinado com o meio *Yeast Malt* (YM) (g/L): glicose 10, peptona 5, extrato de levedura 3, extrato de malte 3 e ágar 20. A fermentação para a obtenção do inóculo foi feita em Estufa B.O.D. SL – 200/370 utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM sem ágar esterilizado a 121°C por 15 min. As condições de cultivo foram 30°C por 24 h.

4.3 Hidrólise Ácida

A etapa de hidrólise foi realizada em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 g de resíduos de alimentos triturados. Nestes resíduos foram adicionados 75 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em diferentes concentrações (0,5%, 0,75% e 1% p/v) e posteriormente foram autoclavados por 15 min a temperatura de 121°C.

Após definido a melhor condição, um volume maior de matéria-prima foi hidrolisado, respeitando a mesma proporção da etapa de hidrólise, para ser utilizado durante a fermentação. O cálculo é demonstrado no item 4.7.

4.4 Fermentação Submersa

Para a fermentação, o hidrolisado obtido após a autoclavagem foi transferido para balão de decantação para a separação da parte sólida, sendo em seguida, centrifugado a 1500 rpm. O líquido obtido após esta etapa foi usado como meio de cultivo.

As fermentações foram feitas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo total 100 mL de meio e inóculo. As variáveis que foram testadas durante esta etapa, foram: temperatura, pH, concentração de inóculo, concentração de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e concentração de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Na Tabela 5 são apresentados os níveis reais e codificados utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} . O tempo total de fermentação foi de 48 h, com amostragem nos tempos de 0, 24 e 48 h.

4.5 Planejamento Experimental

Na etapa de fermentação foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , com o objetivo de determinar quais variáveis influenciavam este processo. O planejamento experimental possuiu o total de 19 ensaios, com três repetições no ponto central e foram avaliadas as variáveis $\text{pH}_{\text{inicial}}$ (X_1), concentração de inóculo em % (X_2), temperatura (X_3), concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g/L (X_4) e concentração de KH_2PO_4 em g/L (X_5). A análise das respostas (concentração celular e teor de álcool) foi feita com auxílio do software *Statistica* versão 7.0. Nas Tabelas 5 e 6 podem ser visualizados os níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios, respectivamente.

Tabela 5: Níveis codificados e reais

Variáveis*	Níveis codificados		
	-1	0	1
$\text{pH}_{\text{inicial}} - X_1$	3	4	5
Concentração de inóculo - X_2 (%)	5	10	15
Temperatura - X_3 (°C)	26	33	40
Concentração $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - X_4 (g/L)	0	1,5	3,0
Concentração de KH_2PO_4 - X_5 (g/L)	0	1,5	3,0

Tabela 6: Matriz dos níveis codificados das variáveis estudadas no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Ensaio	pH _{inicial} (X ₁)	Concentração inóculo (X ₂)	Temperatura (X ₃)	Concentração (NH ₄) ₂ SO ₄ (X ₄)	Concentração KH ₂ PO ₄ (X ₅)
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

4.6 Determinações Analíticas

4.6.1 Determinação da composição centesimal

Para a caracterização das amostras foram feitas as análises de cinzas, umidade, proteína (Kjeldahl) e lipídios (Soxhlet), conforme as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2008).

O método de determinação de proteína de Kjeldahl consiste na transformação do nitrogênio presente na amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico seguido por destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada.

A determinação de lipídios pelo método de Soxhlet com hidrólise prévia tem sua teoria baseada na solubilização de lipídios em solventes como éter de petróleo, n-hexano ou éter etílico anidro.

A determinação de cinzas fundamenta-se na perda de peso ocasionada pela destruição da matéria orgânica quando submetido a incineração a 550°C sem destruir ou evaporar os constituintes minerais.

A determinação de umidade fundamenta-se na evaporação da água e substâncias voláteis. O resíduo de alimentos obtido pelo aquecimento direto é chamado de resíduo seco.

A determinação de carboidrato foi feita segundo o método do Lane-Eynon que consiste na reação de redução de íons cúpricos presentes na solução de Fehling a óxido cuproso por titulação com a solução de açúcar redutor e o ponto final.

4.6.2 Determinação da concentração celular

Para a determinação da concentração celular foi utilizado o método de plaqueamento (BRASIL, 2003). Nas amostras homogeneizadas (suspensão celular) foram feitas diluições, pegando-se 1 mL e transferindo para um tubo de ensaio estéril com 9 mL de água peptonada 0,1% obtendo diluição 1:10. Em seguida, 1 mL desta solução homogeneizada foi transferido para outro tubo com solução de água peptonada, tendo a diluição 1:100, assim sucessivamente. Dos tubos com as diluições homogeneizadas, tomou-se 0,1 mL e semeou-se em placas de petri com meio ABD acidificado a pH 3,5 para promover o crescimento seletivo. As placas de petri foram incubadas a 30°C por 48 h em estufa B. O. D. (SL – 200-370 – SOLAB).

4.6.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi feita pelo potenciômetro PHTEX PHS-3B.

4.6.4 Determinação da concentração de açúcares redutores nos ensaios de fermentação

As amostras foram hidrolisadas e após a autoclavagem foi medido o pH e o mesmo foi corrigido para a faixa de 6 – 7. As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 250 mL, onde foram adicionados as soluções de acetato de zinco 30% (p/v) e ferrocianeto de potássio 15% (p/v) para que ocorresse a clarificação das amostras e consequente eliminação dos interferentes. Em seguida, aguardou-se 15 min para decantação e foram filtrados em papel de filtro quantitativo de 25 µm.

A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita segundo a metodologia Somogyi-Nelson de Nelson (1944), que consiste na redução do cobre a óxido cuproso pelos açúcares redutores. O óxido cuproso é oxidado pelo iodo.

4.6.5 Determinação do teor alcoólico

Das amostras obtidas durante a etapa da fermentação foram destilados 45 mL no micro destilador tipo Kjeldahl, pipetados 10 mL e feita a diluição (1:5) em balão volumétrico 50 mL. A mistura hidroalcoólica obtida foi utilizada para a determinação do teor alcoólico segundo o método desenvolvido por Salik e Povh (1993). Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL desta solução, 2 mL de água destilada e 2 mL de solução de dicromato (42 g de dicromato de potássio, 400 mL de ácido sulfúrico e 1000 mL de água destilada). Os tubos foram tampados e colocados em banho-maria (TE – 056, Tecnal) a 60°C por 30 min. Após este período de tempo as amostras foram retiradas e mantidas a temperatura ambiente, após resfriar a leitura de

absorbância foi feita em espectrofotômetro (BELL Photonics 1105, Tecnal) a 600 nm, usando água destilada para zerar o aparelho e paralelamente foi feito o branco.

Para o cálculo dos resultados foi utilizada a curva padrão, obtida utilizando-se álcool etílico P. A.

4.7 Cálculos

As equações 1, 2 e 3 foram utilizadas para calcular a conversão de açúcar em etanol, o rendimento e a produtividade. O fator de conversão de açúcares redutores totais (ART) em etanol, o rendimento (%) e a produtividade foram calculados ao final de 48 h de fermentação. Para expressar o rendimento em porcentagem utilizou o rendimento teórico de 0,511 g_{etanol}/g_{ART}.

$$Y_{P/ART} = \frac{C_{etanol}}{1,053.(C_{sac\ 0} - C_{sac\ f})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Rend (\%)} = \frac{Y_{P/ART} \cdot 100}{0,511} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$P_{etanol} = \frac{C_{etanol}}{t} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

$Y_{P/ART}$: rendimento de etanol formado em relação aos açúcares redutores totais (g_{etanol}/g_{ART})

C_{etanol} : concentração de etanol g/L ao final de 48 h de fermentação

$C_{sac\ 0}$: concentração de açúcar inicial

$C_{sac\ f}$: concentração de açúcar final

P_{etanol} : produtividade do etanol em g/L.h

t : tempo de fermentação

0,511 = fator estequiométrico para conversão de açúcares redutores em etanol

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos Resíduos

Através dos resultados apresentados na Tabela 7, é possível perceber que o resíduo de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ possui elevado teor de umidade de 68,74% próximo ao teor de umidade de 64,4 % verificado por Cekmeceleoglu e Uncu (2013), porém abaixo dos valores observados por Vavouraki et al. (2012), Yan et al. (2011), Moon et al. (2009) e por Tang et al. (2008), de 81,5%, 79,56%, 81,9% e 80,3%, respectivamente.

Esse alto teor de umidade caracteriza o resíduo de alimentos como uma matéria-prima altamente perecível, com alto potencial para formação de lixiviados/chorume (MAN et al., 2011), contaminantes das águas subterrâneas e que pode envolver grandes gastos de energia para incineração.

Tabela 7: Composição centesimal do resíduo de alimentos da UFRRJ em base úmida

Análises	Média ± DP	CV %
Umidade (%)	68,74 ± 0,43	0,62
Carboidrato (g/100 g)	12,94 ± 0,06	2,48
Lipídio (g/100 g)	6,26 ± 0,24	3,84
Proteína (g/100 g)	6,37 ± 0,63	9,84
Cinzas (g/100 g)	2,71 ± 0,06	2,35
Fibra*	2,98	-

*Obtido por diferença: 100 – (% carboidratos + % lipídios + % proteínas + % cinzas + % umidade)

O teor de carboidrato de 12,94% foi próximo aos resultados encontrados em base úmida por Tang et al. (2008) e Yan et al. (2011) de 11,8% e 14,13%, respectivamente.

A concentração de açúcares varia de acordo com a composição do resíduo de alimentos e, neste caso, não houve grande variação no percentual de açúcares totais encontrados em relação a valores descritos na literatura e os obtidos neste experimento. Os percentuais de lipídios de 6,26%, proteína de 6,37% e cinzas de 2,71% fazem do substrato formado a partir desta matéria-prima rico em fontes de nitrogênio, de minerais e demais nutrientes necessários ao crescimento de leveduras produtoras de etanol, como a *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001apud PACHECO, 2010) os meios de culturas devem fornecer fontes de carbono, hidrogênio e oxigênio e além destes, nitrogênio, fósforo, cálcio, iodo, zinco, magnésio, cobalto, enxofre, potássio, manganês, cobre, ferro, magnésio e outros nutrientes devem estar presentes de forma diluída.

Deste modo, os resíduos de alimentos constituem em um ótimo meio para a produção de etanol por fermentação, visto que por serem restos de comida destinados à alimentação humana são ricos em nutrientes e por sua vez podem suprir as necessidades nutricionais das leveduras produtoras de álcool.

O pH do resíduo do alimento de 4,6 foi próximo ao pH 4,2 e 4,56 observados por Moon et al. (2009) e Yan et al. (2011), respectivamente. Moon et al. (2009) argumentaram que a característica ácida observada nestes resíduos ocorre devido a presença de alimentos ácidos, enlatados e pela presença de ácidos graxos voláteis gerados durante o armazenamento.

Cekmeceleoglu e Uncu (2013) analisaram a composição centesimal em base úmida de resíduos de alimentos e encontraram valores de 64,4 % de umidade, 4,5 % de proteína, 8,8 de lipídio, 1,8 % de cinzas e 20,5 de carboidratos totais.

Embora os resíduos de alimentos analisados nestes experimentos e os analisados na literatura não possuam as mesmas origens e não sejam produzidos em regiões semelhantes e gerados por pessoas de culturas, hábitos e condições financeiras diferentes, pode-se afirmar que possuem características semelhantes com elevada umidade, boas concentrações de açúcares e quantidades consideráveis de lipídios, proteínas e cinzas. Comprovando que resíduos de alimentos podem ser considerados uma alternativa viável para a produção de etanol e para aproveitamento do que antes seria jogado fora, ou aproveitado para atividades de baixo valor econômico, para utilização em fins mais atrativos do ponto de vista econômico como o etanol combustível conforme argumentaram Yan et al. (2011b). E o grande volume gerado mundialmente poderia, em grande parte, complementar a produção de etanol de forma convencional e reduzir os impactos ambientais causados pela disposição inadequada da matéria orgânica.

Em vista das características observadas nos resíduos de alimentos do Restaurante Universitário, substratos a base de fonte de amido e de celulose como restos de cereais, de frutas, de legumes e de verduras podem ser obtidos uma quantidade considerável de açúcares fermentescíveis e conseqüentemente ser tratado como recurso e não como um simples resíduo conforme argumentaram Wang et al. (2008).

Os resultados da caracterização da composição centesimal dos resíduos de alimentos coletados no Restaurante Universitário da UFRRJ demonstraram que o resíduo possui um potencial para a utilização em processos de produção de bioetanol, assim como para outros fins, como a produção de hidrogênio, ácido lático e biobutanol a partir de matéria orgânica.

Os resíduos de alimentos apresentaram maiores teores de umidade e de carboidratos e menores porcentagens de cinzas e fibra. Os desvios padrão e o coeficiente de variação obtidos no tratamento estatístico foram considerados aceitáveis para a caracterização destes resíduos.

5.2 Hidrólise Ácida

As análises de açúcares redutores da etapa de hidrólise foram realizadas em duplicatas e através do tratamento estatístico indica baixo desvio padrão e coeficiente de variação < 10. Os resultados obtidos após a etapa de hidrólise estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Concentração de açúcares redutores nas amostras hidrolisadas

H₂SO₄ (%)	Conc. de açúcares redutores (g/L)	
	Média ± DP	CV %
0,50	24,54± 0,52	2,0
0,75	29,82 ± 0,0	0,0
1,00	43,63± 0,43	1,0

Através dos resultados é possível observar que a hidrólise realizada com H₂SO₄ 1% foi a que resultou a melhor concentração de açúcares redutores, ou seja, nesta concentração foi possível hidrolisar uma maior quantidade de substrato, pois todos os testes foram feitos com

amostras iguais, coletadas nos mesmos dias para que não houvesse nenhuma diferença na composição em função da variabilidade dos pratos servidos no Restaurante Universitário.

A amostra tratada com H_2SO_4 1% proporcionou o maior rendimento de açúcares redutores de 43,63 g/L e foi abaixo da concentração de açúcares redutores obtida por Yan et al. (2011) de 164,8 g/L utilizando a enzima amiloglicosidase. Próximo a concentração de glicose encontrada por Moon et al. (2009) de 44 g/L para resíduos hidrolisados com a enzima carboidrases.

Estes resultados divergiram do trabalho realizado por Oberoi et al. (2010), que utilizando resíduos da casca de laranja a melhor concentração de açúcares redutores de 50,8 g/L foi obtida na hidrólise com H_2SO_4 0,5% e em concentrações superiores de H_2SO_4 (0,75 e 1%) a quantidade de açúcares redutores foi menor no primeiro estágio de hidrólise. A melhor concentração de 29,65 g/L de açúcares redutores obtida no segundo estágio com H_2SO_4 0,75 % (p/v) e além desta última concentração a quantidade de açúcares redutores diminuiu.

A concentração de ácido que proporcionou o melhor resultado também divergiu dos resultados encontrados por Vavouraki et al. (2013) em que a melhor concentração de glicose de 509 mg/g de resíduos seco foi obtido através da hidrólise por H_2SO_4 3%, a 100°C por 30 min, que por sua vez foi menor que a concentração glicose de 539 mg/g de resíduo obtida nas condições de HCl 1,5%, a 120°C por 120 min.

Parthiban et al. (2011) avaliaram o uso HCl e H_2SO_4 em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 N) para hidrólise de resíduos de cascas de bananas *Musa sapientum*, *Musa paradisiaca viridis*, *Musa balbiana* e *Musa acuminata*. As melhores concentrações de açúcares obtidas foram 26,4%, 14,3%, 16,7% e 14,4 %, respectivamente com HCl 0,3 N por 140 min e de 24,6%, 13,2%, 15,4% e 14,1%, respectivamente para hidrólise nas condições de H_2SO_4 0,3 N por 160 min. Pode-se perceber que para ambos os ácidos o comportamento foi o mesmo, onde houve um aumento na liberação dos açúcares até uma certa concentração de ácido e acima da concentração de 0,3 N, a quantidade liberada diminuiu.

Ao comparar os resultados obtidos neste experimento e com os obtidos por Oberoi et al. (2010), Vavouraki et al. (2013) e Parthiban et al. (2011), também foi possível observar que a quantidade de açúcares redutores aumentou com a concentração de H_2SO_4 , porém não é possível afirmar que a partir de 1% (p/v) diminuiria os açúcares livres, nem tão pouco afirmar que em concentrações superiores de H_2SO_4 seria possível obter um melhor rendimento como verificado por Vavouraki et al. (2012) que afirmaram que a melhor concentração foi obtida nas condições de H_2SO_4 3%, por 30 min a 100°C, pois não foram feitos ensaios com concentrações superiores a 1%.

Tais diferenças podem ser justificadas devido a diferença da composição das matérias primas, onde Oberoi et al. (2010) utilizaram resíduos da casca de laranja em pó, que possui como principais componentes celulose e pectina, cuja a hidrólise ácida pode provocar a produção de ácido acético e hidroximetilfurfural. Já os resíduos de alimentos, possuem uma variabilidade de constituintes, como lipídeos, proteínas, celulose, amido e etc.

Em contrapartida podemos afirmar que em virtude das diferenças das características físico-químicas não podem ser utilizados os mesmos tratamentos hidrolíticos para matérias-primas com características diferentes conforme salientou Ei-Zawawy et al. (2011). Os resíduos não se comportam da mesma forma, sendo necessário conhecer as propriedades da matéria-prima a ser empregada (EI-ZAWAWY et al., 2011) para que tenha o melhor rendimento, eficiência e redução de custo com essa etapa tão importante.

Trabalhos realizados por Moon et al. (2009) e por Yan et al. (2011) investigaram o uso da enzima amiloglicosidase para hidrolisar resíduos de alimentos, as condições de tempo e pH

foram próximas e a temperatura variou, sendo 50°C para o primeiro e 55°C para o segundo. Foram encontradas diferentes concentrações de açúcares redutores, sendo 52 g/L e 164,8 g/L, respectivamente. Diferenças na matéria-prima heterogênea e no tratamento empregado pode fazer com que se obtenham concentrações diferentes, mesmo utilizando a mesma enzima.

El-Zawawy et al. (2011) avaliaram diferentes pré-tratamentos para posterior hidrólise enzimática e fermentação para a produção de etanol a partir de resíduos da bananeira, de sabugo de milho e palha do arroz. Entre os pré-tratamentos utilizados estão, a explosão à vapor, uso de ácido em um sistema montado com micro-ondas, hidrólise alcalina e hidrólise ácida diluída. Para a hidrólise ácida diluída, a melhor concentração de H₂SO₄ foi de 5% (p/v). Tais autores concluíram que a concentração de glicose é diferente de acordo com o tipo de pré-tratamento empregado e que a produção de etanol também foi possível a partir das diferentes matérias-primas, porém o rendimento foi diferenciado para cada matéria-prima utilizada.

Diante dos experimentos realizados por El-Zawawy et al. (2011) pode-se afirmar que as diferenças de concentração de açúcares redutores entre o resíduo obtido do Restaurante Universitário e os resíduos de alimentos de outros países relatados neste trabalho em função da matéria-prima ser diferente e das diferentes condições a que foram tratados ora com ácidos em concentrações, temperatura de reação e tempo de residência diferentes, ora por diferentes enzimas.

No tocante a hidrólise ácida, Vavouraki et al. (2013) relataram que HCl e H₂SO₄ tiveram comportamentos semelhantes a temperatura de 50°C em todas as concentrações estudadas (0,7; 1,5; 3%) e tempos de residências testados (30, 60 e 120 min). Entretanto, em temperaturas mais elevadas, 100°C e baixas concentrações de ácidos HCl (0,7 e 1,5%) foi mais eficiente que o H₂SO₄ em todos os tempos de residência testados. Estes autores relataram que o parâmetro tempo de residência foi mais importante para a solubilização da amostra do que a força do ácido a mesma temperatura.

Em escala industrial, o pré tratamento com H₂SO₄ é mais utilizado industrialmente devido gerar menos problemas de degradação e corrosão de equipamentos de hidrólise (VAVOURAKI et al., 2013).

Após definido a melhor condição de hidrólise de H₂SO₄ 1% por 15 min a 121°C, todos os ensaios realizados na etapa seguinte (fermentação) foram realizados nestas mesmas condições para a obtenção do meio de cultivo e através de planejamento fatorial 2⁵⁻¹ foram estudadas outras variáveis.

Esperava-se que as concentrações iniciais de açúcares permanecessem próximas em todos os ensaios. Porém, foi observado que esta concentração variou de um ensaio para o outro.

Diversos trabalhos na literatura reportaram o uso de dois estágios de hidrólise para obtenção de açúcares fermentescíveis. Em um deles, Cheng et al. (2008) utilizaram duas etapas para aumentar a concentração de açúcares redutores nos meios e para isso, foi realizado uma primeira etapa de hidrólise por H₂SO₄ 1,25% e o líquido foi separado da parte sólida por filtração. A parte sólida foi lavada com água quente a 60°C e adicionado ao líquido sacarificado novamente e então adicionados novamente H₂SO₄ 1,25% reconstituído e levados a autoclave, ou seja, nas mesmas condições. E no presente trabalho, ao realizar a etapa de esterilização do sacarificado o procedimento foi feito nas condições dos ensaios a serem realizados no fatorial fracionado, ou seja, todos diferentes.

É válido ressaltar que para acertar o pH_{inicial}, de acordo com o delineamento experimental, foi adicionado NaOH 6 M ou NaOH 1 M. Após a etapa de esterilização foi observado uma coloração escura conforme a Figura 2.

Vavouraki et al. (2013) relataram que a hidrólise alcalina com NaOH provocou o escurecimento do meio e a perda de açúcares redutores por reação de Maillard, inviabilizando o processo de hidrólise alcalina sob altas temperaturas. E neste presente estudo, apesar de NaOH não ter sido adicionado com intuito de influenciar a hidrólise e sim para acerto de pH, pode ter provocado o escurecimento do meio, bem como a formação dos grumos que interferiram no processo de determinação da concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae* por espectrofotometria e por massa seca, bem como na quantidade de açúcares redutores inicial.

Wang et al. (2008) avaliaram a fermentação esterilizada e não esterilizada para a produção de etanol a partir de resíduos de alimentos e foi verificado que a fermentação que não recebeu tratamento térmico de esterilização foi a que obteve a melhor concentração de etanol de 33,05 g/L nas condições de pH 4,18 a 35°C. Segundo estes autores o processo realizado em autoclave pode ocasionar um efeito negativo, tais como degradação de substrato, como açúcares e outros nutrientes. Estes autores afirmam que reação de Maillard pode ocorrer e degradar açúcares e aminoácidos presentes no meio de fermentação.

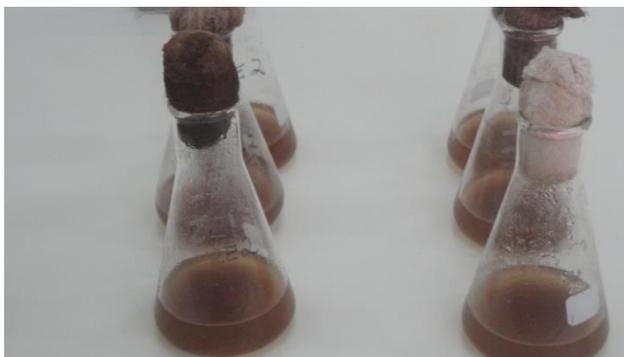


Figura 2: Foto dos meios esterilizados com escurecimento, indicando possível reação de Maillard.

Para Vavouraki et al. (2013) a fermentação aberta e sem a esterilização possui mais vantagens do que o sistema convencional e esterilizado, pois não degrada açúcares. A fermentação aberta e sem esterilização pode ser feita em áreas de armazenamento dos resíduos com redução de custo e de gasto com energia (WANG et al., 2008).

Em hidrólise ácida diluída, os rendimentos são de 50% para a glicose. Segundo Seabra (2008) para hidrólise ácida diluída de resíduos lignocelulósicos, o processo deve ocorrer em condições brandas, como por exemplo, 0,7% H_2SO_4 , 190°C por 3 min para recuperar as pentoses. E numa segunda etapa, utiliza condições mais severas de tratamentos (0,4 % H_2SO_4 , 215°C por 3 min para recuperação das hexoses.

O processo de hidrólise enzimática oferece muitas vantagens em relação aos processos de hidrólise por ácido diluído e ácido concentrado, pois podem alcançar altos rendimentos sob condições moderadas (CORAL, 2009). Em resíduos celulósicos, o processo hidrolítico realizado por enzimas pode alcançar rendimentos superiores a 0,85 $\frac{g_{glicose}}{g_{celulose}}$ (CORAL, 2010). Porém o desafio deste método está no tempo demandado para que ocorra a hidrólise e o elevado custo (CORAL, 2009).

A hidrólise química por ácido diluído oferece uma alternativa ao tratamento de resíduos de alimentos, porém, torna-se necessário, pesquisas que possam chegar a rendimentos em açúcares redutores mais elevados e para minimizar a formação de compostos inibitórios de micro-organismos fermentadores.

5.3 Produção de Etanol – Delineamento Fatorial Fracionado

O delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) foi utilizado para obter os resultados preliminares para a produção de etanol e avaliar a influência das variáveis estudadas (pH, temperatura, concentração de inóculo, concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e concentração de KH_2PO_4). As variáveis utilizadas no fatorial fracionado, os seus níveis reais, níveis codificados e matriz dos ensaios estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Na Tabela 9 é possível observar a concentração de açúcares redutores e a variação de pH em 0, 24 e 48 h.

Tabela 9: Concentração de açúcares redutores e variação de pH em 0, 24 e 48 h

Ensaio	Conc. de açúcares redutores (g/L)			pH		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
1	5,2	5,4	1,2	3,28	3,23	3,32
2	6,5	2,8	0,9	5,13	4,68	4,65
3	5,9	3,1	1,4	3,46	3,39	3,38
4	6	1,61	0,53	4,90	4,62	4,60
5	5,2	4,5	2,8	3,15	3,09	3,15
6	6,4	3,1	0,5	5,10	4,70	4,70
7	4,6	3,2	0,4	3,25	3,15	3,17
8	5,2	3,3	0,5	5,16	4,7	4,65
9	6,4	2,3	0,7	3,13	2,99	3,18
10	6,4	1,8	0,7	5,15	4,54	4,65
11	6,4	1,2	0,7	3,30	3,26	3,44
12	7,2	1,2	0,6	5,16	4,31	4,66
13	6,9	0,7	0,6	3,12	3,03	2,93
14	6,7	0,6	0,6	4,84	4,31	4,30
15	6,5	0,5	0,3	3,35	3,15	3,10
16	5,6	0,5	0	5,00	4,60	4,53
17	6,8	0,8	0,6	4,11	3,80	3,80
18	6,8	0,8	0,6	4,24	3,86	3,85
19	6,9	0,9	0,6	4,26	3,86	3,88

Na Tabela 9 é possível observar que na maioria dos ensaios houve uma pequena diminuição no valor do pH, variando no máximo 0,6. Exceto os ensaios 1, 9 e 11, onde a variação foi para valores acima do pH inicial, com variação de 0,14 no máximo. Nos ensaios em que o pH decresceu, os valores mais baixos (pH 3) a variação foi menor que nos ensaios com pH 4 e 5. O único ensaio onde o pH final foi igual ao pH inicial foi o ensaio 5.

Parthiban et al. (2011) estudaram a variação do pH em meios de cultura provenientes de resíduos da casca de diferentes espécies de banana e foi observado que o pH sofreu uma variação de no máximo 0,3 para mais em relação ao pH inicial 5,0.

Segundo Steckelberg (2001) em pH extracelular de 2 a 7, o pH interno das células varia de 5,8 a 6,9. Em valores de pH abaixo de 2, a célula do micro-organismo gastará mais energia para a manutenção do pH intracelular. Este mesmo autor acrescenta que o pH do meio externo pode afetar o crescimento das leveduras, onde o crescimento máximo ocorre entre pH 5 e 6.

O pH é um importante fator que pode afetar a fermentação alcoólica, pois valores mais baixos podem provocar a sensibilidade dos micro-organismos ao etanol produzido (AMARAL, 2009). Os ensaios que apresentaram os melhores resultados para a produção de etanol de 2,46 e 2,33 g/L, nos ensaios 6 e 11, respectivamente, possuem valores diferentes de pH, 5 e 3, respectivamente..

Segundo Steckelberg (2001) o pH ótimo para a produção do etanol utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é entre 4 e 5, ao aumentar até pH 7,0 o rendimento produção de etanol diminui com aumento da produção de ácido acético.

Os resultados para a produção de etanol estão apresentados na Tabela 10, onde é possível perceber que a máxima produção de etanol foi de 2,46 g/L e 2,33 g/L nos ensaios 6 e 11 em 48 h. A menor produção foi de 0,64 g/L no ensaio 13 em 48 h. Em 24 h de fermentação, os melhores resultados de 2,24 g/L e 1,47 g/L de etanol foram obtidos no ensaio 6 e 11, respectivamente.

Em 24 h os ensaios que menos produziram foram o 1, 5 e 13, já em 48 h foram os ensaios 13 e 16. Os ensaios 13 e 16 tiveram em comum a mesma temperatura (40°C) e os ensaios 1 e 5 tiveram o mesmo valor de pH 3,0 e a mesma concentração de inóculo (5%) e ambos sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No tocante ao consumo de açúcares foi verificado que o ensaio 16 (pH 5, 15% de inóculo, 40°C, 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de KH_2PO_4) todo o açúcar foi consumido após 48 h de fermentação, porém obteve uma baixa concentração de etanol de 0,96 g/L em 48 h. O menor consumo de açúcares redutores ocorreu no ensaio 5 (pH 3, 15% de inóculo, 40°C, sem adição de nutrientes) onde a concentração final de açúcares redutores foi de 1,5 g/L, 1,15 g/L de etanol, produtividade de 0,002 g/L.h.

Com exceção dos ensaios 3, 7, 13, 16 e 17, a produção de etanol foi maior em 48 h de fermentação. Os melhores valores de produtividade foram observados nos ensaios 6 e 11, ambos com 0,005 g/L.h.

Tabela 10: Concentração de etanol (g/L) em 24 e 48 h, rendimento (g/g), rendimento (%) e produtividade (g/L.h)

Ensaio	Concentração de etanol (g/L)		Rendimento $Y_{P/ART}$	Rendimento (%)	Produtividade de etanol (g/L.h)
	24 h	48 h			
1	1,12	1,39	0,33	64,58	0,03
2	1,43	1,47	0,25	48,78	0,03
3	1,40	1,00	0,21	41,30	0,02
4	1,33	1,71	0,28	55,85	0,04
5	1,11	1,15	0,34	66,79	0,02
6	2,24	2,46	0,39	77,49	0,05
7	1,23	1,20	0,27	53,10	0,03
8	1,18	1,27	0,26	50,22	0,03
9	1,27	1,37	0,23	44,67	0,03
10	1,14	1,42	0,24	46,30	0,03
11	1,47	2,33	0,39	75,97	0,05
12	1,24	1,40	0,20	39,42	0,03
13	0,77	0,64	0,09	18,88	0,01
14	1,31	1,00	0,18	35,04	0,02
15	1,23	1,14	0,17	34,17	0,02
16	1,43	0,96	0,16	31,86	0,02
17	1,40	1,39	0,21	41,67	0,03
18	1,32	1,47	0,22	44,06	0,03
19	1,32	1,49	0,22	43,95	0,03

Ao observar a Tabela 10 é possível perceber que os melhores rendimentos foram alcançados no experimento 6 (pH 5, concentração de inóculo 5%, temperatura 40°C, 3 g/L de KH_2PO_4 e 0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) onde a produção de etanol também foi maior em relação aos outros ensaios, ficou próximo ao rendimento teórico de 0,511 e 91,44% e a melhor produtividade de 0,005 g/L.h. Rodrigues (1998) argumenta que quando é observado rendimentos iguais ou superiores a 100% evidencia a existência de erros na metodologia analítica, pois inevitavelmente será formado outros produtos que são sintetizados a partir do açúcar e rendimentos muito baixo deixam a dúvida se é por falta de nutrientes no meio ou pela falha na metodologia.

O rendimento mais baixo foi observado no ensaio 13 (pH 3, concentração de inóculo de 5%, temperatura 40°C, 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3 g/L de KH_2PO_4) no tempo de 48 h, com a menor produção de etanol de 0,64 g/L e menor produtividade de 0,01 g/L.h.

No tocante a temperatura, a melhor concentração de etanol de 2,46 g/L no ensaio 6 e a menor concentração de etanol de 0,64 g/L no ensaio 13 foram obtidas sob a mesma temperatura (40°C) e mesma concentração de KH_2PO_4 e diferentes níveis de pH, concentração de inóculo e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para Meneses (1980 apud PACHECO, 2010) a temperatura

influencia todo o processo de fermentação, sendo a faixa recomendada entre 25 e 36°C. Abaixo deste valor a fermentação ocorre de forma muito lenta e acima (40°C) o álcool pode evaporar.

Pode ser visto que o ensaio 12 (15% de inóculo, pH 5, 26°C e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e no ensaio 2 (pH 3, 5% de inóculo e 26°C) possuem apenas a temperatura com nível comum e a produção de etanol para os dois ensaios, foram aproximadas, sendo 1,4 g/L e 1,47 g/L, respectivamente.

A máxima concentração de etanol obtida de 2,46 g/L foi inferior aos resultados encontrados para a produção de etanol a partir de resíduos de alimentos. A máxima concentração de etanol obtida por Wang et al. (2008), Kim et al. (2008), Jeong, Kim e Lee (2012), Yan et al. (2011b) foram de 33,05 g/L, 57,6 g/L, 40,59 g/L, 89,28 g/L, respectivamente. A baixa concentração de etanol obtida pode ter sido provocada pelo baixo rendimento da hidrólise e pelos problemas ocasionados na etapa de esterilização, em que pode ter havido a perda de açúcares redutores e a formação de compostos inibidores da fermentação, visto que a taxa de crescimento da levedura não foi elevada, conforme pode ser visto na Tabela 11, onde é apresentado o crescimento celular em UFC/mL nos tempos de 0, 24 e 48 h de fermentação.

Quanto ao crescimento celular, foi verificado que a levedura apresentou melhor crescimento em ensaios que possuem o pH nos três valores estudados (3, 4 e 5), não sendo possível afirmar que em um determinado valor houve um melhor crescimento celular

Tabela 11: Crescimento celular em UFC/mL

Ensaio	Tempo de fermentação		
	0 h	24 h	48 h
1	$4,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
2	$4,2 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$7,9 \times 10^6$
3	$1,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
4	$9,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
5	$3,8 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
6	$3,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
7	$8,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
8	$6,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
9	$3,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$
10	$3,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
11	$8,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
12	$8,5 \times 10^5$	$4,9 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$
13	$2,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$
14	$2,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
15	$9,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
16	$3,6 \times 10^5$	$1,24 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
17	$7,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
18	$7,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
19	$7,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$

O crescimento celular no ensaio 13 foi elevado e obteve uma das menores concentrações de etanol, o que pode confirmar o argumento de Rodrigues (1998) que meios com concentrações de nutrientes (nitrogênio e sais minerais) ideais as leveduras utilizam cerca de 5% de açúcares presentes no meio para o crescimento e que em altas concentrações dos mesmos nutrientes, as leveduras utilizam uma porcentagem maior de açúcares para o crescimento, consequentemente deixando de produzir etanol.

Para o crescimento celular os ensaios 1, 2, 12 e os três pontos centrais 17, 18 e 19 apresentaram maior crescimento celular em 48 h, os demais ensaios apresentaram maiores contagens no tempo de 24 h e no tempo de 48 h foi observado a desaceleração ou declínio celular.

Tang et al. (2008) avaliaram o crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* KF-7 na produção de etanol a partir de resíduos de alimentos sacarificados através do uso de enzimas glicoamilase. Cada ensaio foi inoculado com 10^8 /mL e ao final do processo havia cerca de 20% de células viáveis.

Jeong, Kim e Lee (2012) avaliaram o crescimento das leveduras *S. coreanus* e *P. stipitis* para a produção de etanol a partir de resíduos de alimentos hidrolisados por enzimas comerciais *Spirizyme* Plus FG e *Viscozyme* L em fermentação aeróbia e anaeróbia. Na fermentação anaeróbia e aeróbia, a biomassa permaneceu inalterada após 48 h para *S. coreanus*, o crescimento da levedura não foi afetado pelo oxigênio. As análises do crescimento da levedura pelo método espectrofotométrico mostrou para *S. coreanus* que a concentração final de células foi cerca de 80 g/L para as condições anaeróbicas e aeróbicas. Para *P. stipitis* o suprimento de oxigênio afetou o crescimento da biomassa.

Oberoi et al. (2010) avaliaram o crescimento celular durante a produção de etanol a partir de resíduos da casca de laranja hidrolisados por H_2SO_4 . A concentração inicial de *S. cerevisiae* foi próximo a 5 g/L e a concentração final de biomassa foi em torno de 10 g/L para ambos os meios fermentados a partir da hidrólise primária e da hidrólise secundária.

A análise estatística dos resultados de concentração celular foi realizada e a estimativa dos efeitos para o crescimento celular em 48 h é apresentada na Tabela 12. É possível observar que através do p-valor que as variáveis pH (X1) e temperatura (X3) foram consideradas significativas ao nível de confiança de 90%. Um incremento na resposta temperatura (nível -1 para +1) conduziu a diminuição do crescimento celular, ao passar da temperatura de 26°C para 40°C houve diminuição dos resultados. A variável temperatura foi a que mais influenciou o crescimento microbiano.

Foi realizado o tratamento estatístico para a produção de etanol em 48 h, os resultados podem ser visualizados na Tabela 13. É possível perceber que para a produção de etanol as estimativas dos efeitos demonstraram que nenhuma das variáveis foram consideradas significativas ao nível de confiança de 90%.

Tabela 12: Estimativa dos efeitos para a concentração celular (UFC/mL) para 48 h

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média*	2307895	374788,4	6,16	< 0,0001
x ₁ *	1666250	816832,3	2,04	0,0622
x ₂	143750	816832,3	0,17	0,8630
x ₃	-2213750	816832,3	-2,71	0,0178
x ₄	-561250	816832,3	-0,69	05041
x ₅	-933750	816832,3	-1,14	0,2736

X₁ – pH_{inicial} X₂ - concentração de inóculo (%); X₃ - temperatura (°C); X₄ - concentração (NH₄)₂SO₄ (g/L) e X₅ - concentração KH₂PO₄

Tabela 13: Estimativa dos efeitos para a concentração de etanol (g/L) em 48 h

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	1,390	0,099	13,96	<0,001
x ₁	0,202	0,217	0,93	0,3679
x ₂	-0,005	0,217	-0,02	0,9819
x ₃	-0,265	0,217	-1,22	0,2438
x ₄	-0,155	0,217	-0,71	0,4878
x ₅	0,270	0,217	1,24	0,2355

X₁ – pH_{inicial} X₂ - concentração de inóculo (%); X₃ - temperatura (°C); X₄ - concentração (NH₄)₂SO₄ (g/L) e X₅ - concentração KH₂PO₄

Este planejamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹ pode ser utilizado como triagem das variáveis que podem influenciar o processo de produção de etanol a partir de resíduos de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ e a partir dele serem elaborados novos planejamentos experimentais fracionados ou completos para que se possam chegar às condições ótimas para a obtenção de etanol.

Segundo Teófilo e Ferreira (2006) experimentos de triagem visam a seleção de variáveis e de interações entre as múltiplas variáveis de um processo que podem influenciar significativamente. Estes autores acrescentam que no estudo de triagem, as interações entre as variáveis (interação principal) e de segunda ordem, obtidas em planejamentos fatoriais completos ou fracionários, é de grande relevância para compreensão do sistema de produção.

6 CONCLUSÕES

A partir deste trabalho pode-se concluir que a hidrólise ácida (H_2SO_4) com a concentração de 1% (p/v) foram obtidas as melhores concentrações de açúcares redutores de 43,63 g/L. Porém, o rendimento foi baixo e houve perdas de açúcares redutores na etapa de esterilização, bem como a formação de compostos inibidores da fermentação, visto que a taxa de crescimento das leveduras foi relativamente pequena.

Assim, cabe ressaltar que para o processo de produção de etanol utilizando hidrólise ácida diluída, torna-se necessário haver pesquisas que busquem encontrar condições que possam aumentar o rendimento em açúcares redutores, visto ser inferior aos rendimentos encontrados na literatura quando é utilizado o método enzimático.

A hidrólise ácida oferece como benefício ser mais barata que a enzimática, porém o baixo rendimento e a baixa concentração de etanol obtida podem fazer com que este método não seja viável para a produção de etanol a partir de matérias-primas como o resíduo de alimento.

Dados das características da composição centesimal dos resíduos de alimentos do Restaurante Universitário da UFRRJ indicam que há 12,94 % de carboidrato, 6,26 % de lipídios, 66,37 % de proteína 2,71 % de cinzas, 2,98% de fibras e 68,74% de umidade. As características físico-químicas revelam que os restos de alimentos possuem um alto potencial para obtenção de biomassa alternativa para a produção de etanol e de fornecer nutrientes nitrogenados e minerais para suprir as necessidades do metabolismo celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Conseqüentemente suprir a crescente demanda por combustível nos últimos anos e diminuir a quantidade de material disposto de maneira inadequada e sem elevado valor comercial. O uso de resíduos de alimentos pode em grande parte minimizar os impactos ambientais como emissões de CO_2 e chorume.

A melhor concentração de etanol obtida foi 2,46 g/L, com rendimento de 91,44 % e produtividade de 0,005 g/L.h no ensaio 6. Em relação aos efeitos das variáveis para o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, as variáveis pH e temperatura foram consideradas significativas. E nenhuma das variáveis foi considerada significativa para a produção de etanol ao nível de confiança de 90%.

Foi obtido uma baixa concentração de etanol em relação aos trabalhos relatados na literatura. Assim, a hidrólise química pelo uso de H_2SO_4 deve ser investigada acerca das melhores condições de tratamento e posterior esterilização e fermentação em batelada simples.

Portanto a produção de etanol a partir de resíduos de alimentos foi possível e pode em grande parte diminuir a poluição gerada por este tipo de resíduo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a formação de compostos inibitórios para hidrolisados por ácido diluído
- Avaliar metodologias de desintoxicação do hidrolisado
- Estudar o efeito da combinação de temperatura com diferentes concentrações de ácidos e tempo de residência.
- Avaliar a aplicação de hidrólise ácida prévia sequenciada pela hidrólise enzimática quanto a formação de compostos inibitórios que possam inibir a reação enzimática
- Utilizar diferentes cepas de micro-organismos para avaliar a capacidade de transformação de hidrolisados de alimentos em álcool

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, F. S. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação de mostos da sacarose**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Uberlândia, 2009.

ANTONINI, S. R. C. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. In: **Curso de treinamento ministrado a unidades pertencentes à Usina de Açúcar Santa Teresinha**, 2004. Disponível em < <http://www.ciencialivre.pro.br> > Acesso em 05 de março de 2012.

AUGUSTINI, V. C. M.; KISHIMOTO, P.; TESCARO, T. C.; ALMEIDA, F. Q. A. Avaliação do índice de resto-ingesta e sobras em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) de um empresa metalúrgica na cidade de Piracicaba/SP. **Revista Simbio-Logias**, v.1, n. 1, p. 99-110, 2008.

BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; MENDU, D. R.; MADICHERLA, N. R.; CHITYALA, A. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 209-214, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 62**, de 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. **Plano nacional de agroenergia 2006-2011**. 2ª edição revisada. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Versão pós-audiência e consulta pública para conselhos nacionais. Brasília, 2012.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir dos resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 36-52, 2005.

CEKMECELIOGLU, D.; UNCU, O. N. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of pretread kitchen wastes for enhancing bioethanol production. **Waste Management**, v. 33, n. 3, p. 735-739, 2013.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOW, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

CHESTER, M.; MARTIN, E. Cellulosic ethanol from municipal solid waste: A case study of the economic, energy, and greenhouse gas impacts in California. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 14, p. 5183-5189, 2009.

CNI. Fórum Nacional Sucroenergético. **Bioetanol – o futuro renovável**. Brasília: Confederação Nacional da Indústria, 2012.

CONAB. . Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2011-2012, segundo levantamento**. Brasília, 2011.

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2012-2013, primeiro levantamento**. Brasília, 2012.

CORAL, D. S. O. **Indicadores técnicos – econômicos das rotas termoquímica e bioquímica para obtenção e biocombustíveis utilizando bagaço de cana para as condições brasileiras**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Itajubá, 2009.

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALD, A. complete and efficient enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 937-941, 2002.

EI-ZAWAWY, W. K.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MORSI, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 865-871, 2011.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 145f. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, V. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

FAO - Food Agriculture Organization of the United Nations. **Global food losses and food waste**. International Congress Save Food, Rome, 2011.

FERNANDES, A. P. F. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática**. 2008. 177 f. Dissertação (Doutorado em Biologia) – Lisboa, 2008.

FERREIRA, R. C. G. **Caracterização do complexo coesina de *Trypanosoma cruzi***. 2011. 109 f., Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Brasília, 2011.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Synergistic saccharification and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1207-1212, 2004.

GONÇALVES FILHO, L. C. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Joinville, 2011.

GONG, M. Z.; GONG, D. C.; LU, Y. C.; HUANG, Y. P. Study on the effect of fractionation pretreatment process on the enzymatic hydrolysis of switch grass for bioenergy and biorefinery. **International Conference on Advances in Energy engineering**, 2010. Disponível em < <http://ieeexplore.ieee.org> > Acesso em 13/03/2012.

GOUVEA, B. M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1315-1319, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GROHMANN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 129-141, 1995.

HA, J. H.; GANG, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Evaluation of sediments of the waste from beer fermentation broth for bioethanol production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 9, p. 1224-1231, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores do desenvolvimento sustentável: Brasil, 2010**. Rio de Janeiro, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos – 4ª Edição – 1ª Digital**. São Paulo, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEONG, S.; KIM, Y.; LEE, D. Ethanol production by co-fermentation of hexose and pentose from food wastes using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 8, p. 1038-1043, 2012.

KIM, J. H.; LEE, J. C.; PAK, D. Feasibility of production ethanol from food waste. **Waste Management**, v. 31, n. 9-10, p. 2121-2125, 2011.

KIM, J. K.; OH, B. R.; SHIN, H.; EOM, C.; KIM, S. W. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1308-1312, 2008.

KRISHNA, S. H.; CHOWDARY, G. V. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1971-1976, 2000.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 3713-3729, 2009.

LEITE, B. Z.; PAWLOWSKY, U. Alternativas de minimização de resíduos em uma indústria de alimentos na região metropolitana de Curitiba. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 96-105, 2005.

LI, P.; CHEN, M. Ethanol fermentation from cassava pulp by a novel sequential co-culture. **International Conference on Materials for Renewable Energy e Environment (ICMREE)**, p. 412-417, 2011. Disponível em < <http://ieeexplore.ieee.org> > Acesso em 13 de março de 2012.

MA, H.; WANG, Q.; QIAN, D.; ZHANG, W. The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage. **Renewable energy**, v. 34, n. 6, p. 1466-1470, 2009.

MAN, H. L.; RENE, E. R.; BECHERA, S. K.; PARK, H. Main and interaction effects of process parameters on the ethanol production capacity of food-waste leachate by *Saccharomyces cerevisiae*. **KSCE Journal of Civil Engineering**, v. 15, n. 6, p. 1015-1022, 2011.

MOON, H. C.; SONG, I. L.; KIM, J. C.; SHIRAI, Y.; LEE, D. H.; KIM, J. K.; CHUNG, S. O.; KIM, D. H.; OH, K.K.; CHO, Y.S. Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol production and ethanol fermentation. **International Journal of Enzymatic of Energy Research**, v. 33, n. 2, p. 164-172, 2009.

MORAES, D. C.; MURARI, C. S.; AQUINO, P. L. M.; BUENO, G. F.; BIANCHI, V. L. D. Avaliação da fermentação aeróbia para produção de etanol a partir de xilose por linhagens de leveduras isoladas da casca de uva (*Vitis spp*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 117-122, 2013.

MOXLEY, G.; ZHU, Z.; ZHANG, Y. P. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7885-7890, 2008.

NADIR, N.; MEL, M.; KARIM, M. I. A.; YUNUS, R. M. Comparison of sweet sorghum and cassava for ethanol production by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 17, p. 3068-3073, 2009.

NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M. Inulin-containing biomass for ethanol production: carbohydrate extraction and ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 132, n. 1-3, p. 922-932, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: RR Donnelley, 2002.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination fo glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NONINO-BORGES, C. B.; RABITO, I. E.; SILVA, K.; FERRAZ, C. A.; CHIARELLO, P. G.; SANTOS, J. S.; MARCHINI, J. S.; Desperdício de alimentos intra-hospitalar. **Revista Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 349-356, 2006.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MADL, R. L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J. P. Ethanol production from Orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through Experimental Design. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3422-3429, 2010.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; MANJUDASWAMY, A.; BANSAL, S.; SINGH, S.; KAUR, S.; BABBAR, N. Enhanced ethanol production from kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1593-1601, 2011.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras característica flocculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 106 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Uberlândia, 2010.

PARTHIBAN, R.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Ethanol production from banana peel waste using *Saccharomyces cerevisiae*. **Chennai and Dr. MGR University second international conference on sustainable energy and intelligent system**, Índia, 20-22 de julho, 2011.

PEREIRA, F. C. **Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae***. 115f. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Porto Alegre, 2010.

PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme Microbial Technology**, v. 8, n. 6, p. 360-364, 1986.

RATNAM, B. V. V.; NARASIMHA RAO, M.; DAMODAR RAO, M.; SUBBA RAO, S.; AYYANNA, C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 523-526, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos** 2ª ed – São Paulo: Editora Blucher, 2007.

RICARTE, M. P. R.; FÉ, M. A. B. M; SANTOS, I. H. V. S. Avaliação do desperdício de alimento em uma Unidade- de Alimentação e Nutrição institucional em Fortaleza – CE. **Saber científico**, v. 1, n. 1, p. 158-175, 2008.

RODRIGUES, L. M.; DANTAS, R.; FINZER, J. R. D. Utilização de produto natural durante a fermentação alcoólica visando uma produção que se enquadre nos parâmetros de atividade sustentável. **Fazu em Revista**, Uberaba, n. 6, p. 53-82, 2009.

RODRIGUES, R. A. **Avaliação de técnicas analíticas no monitoramento do rendimento da fermentação alcoólica**. 130 f. 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Campinas, 1998.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 76, n. 2, p. 65-77, 1999.

SALIK, F. L. M.; POVH, N. P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. **Processamento, engenharia industrial e derivados**, p. 262-266, 1993.

SANTOS, D. S.; CAMELO, A. C.; RODRIGUES, K. C.; CARLOS, L. C.; PEREIRA Jr, N. Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 93-105, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 2008. 274f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Campinas, 2008.

SHAHSAVARANI, H.; HASEGAWA, D.; YOKOTA, D.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S. Enhanced bio-ethanol production from cellulosic material by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ 14. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 20-23, 2013.

SHARMA, N.; OBEROI, H. S.; BANSAL, S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 310-316, 2007.

SIVERS, M. V.; ZACCHI, G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 2-3, p. 131-140, 1996.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 6, p. 416-425, 2007.

SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 63-69, 2000.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de concentração celular e características cinéticas**. 215 f. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Campinas – SP. 2001.

SU, W.; MA, H.; GAO, M.; ZHANG, W.; WANG, Q. Research on biodiesel and ethanol production from food waste. **International conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)**, p. 1-4, 2010. Disponível em < <http://ieeexplore.ieee.org> > Acesso em 05 de março de 2012.

TANAKA, M.; OZAKI, H.; ANDO, A.; KAMBARA, S.; MOROTOMI, H. Basic characteristics of food waste and food ash on steam gasification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 7, p. 2414-2419, 2008.

TANG, Y.; KOIBE, Y.; LIU, K.; AN, M.; MORIMURA, S.; XU, X.; KIDA, K. Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 11, p. 1037-1045, 2008.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M .C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TSAI, S.; OH, J.; SINGH, S.; CHEN, R.; CHEN, W. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6087-6093, 2009.

UNICA. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**. União das Indústrias de cana-de-açúcar, 2007. Disponível em > http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/producao_etanol_unica.pdf > Acesso em: 05/01/2013

VAHEED, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; GALIP, H. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 101-111, 2011.

VALLE, D. A. **Isolamento, identificação molecular e análise do metabolismo de leveduras extraídas de fontes vegetais para a produção de cerveja**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial) – Curitiba, 2012.

VAVOURAKI, A. I.; ANGELIS, E. M.; KORNAROS, M. Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. **Waste Management**, v. 33, n. 3, p. 740-745, 2013.

VELÁSQUEZ, H. I.; OLIVEIRA, S. D.; BENJUMEA, P.; PELLEGRINI, L. F. Exergo-environmental evaluation of liquid biofuel production processes. **Energy**, v. 54, n. 1, p. 97-103, 2013.

VIRUNANON, C.; OUEPHANIT, C.; BURAPATANA, V.; CHULAKSANANUKUL, W. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. **Journal of Cleaner Production**, v. 39, p. 273-279, 2013.

WANG, Q.; MA, H.; XU, W.; GONG, L.; ZHANG, W.; ZOU, D. Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 4, p. 604-610, 2008.

WANG, Q.; YAMABE, K.; NARITA, J.; MORISHITA, M.; OHSUMI, Y.; KUSANO, K.; SHIRAI, Y.; OGAWA, H. I. Suppression of growth of putrefactive and food poisoning bacteria by lactic acid fermentation of kitchen waste. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 351-357, 2001.

WEI, S.; MA, H.; GAO, M.; ZHANG, W.; WANG, Q. Research on biodiesel and ethanol production from food waste. **International Conference on Bioinformatics and biomedical Engineering (iCBBE)**, 18 – 20 June, 2010

WILKINS, M. R.; SURYAWATI, L.; MANESS, N. O.; CHRZ, D. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1161-1168, 2007.

XU, J.; SMITH, J. C. Probing the mechanism of cellulosome attachment to the *Clostridium thermocellum* cell surface: computer simulation of the type II cohesin-dockerin complex and its variants. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 23, n. 10, p. 759-768, 2010.

YAN, S. WANG, P.; ZHAI, Z.; YAO, J. Fuel ethanol production from concentrated food waste hydrolysates in immobilized cell reactors by *Saccharomyces cerevisiae* H058. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 731-738, 2011b.

YAN, S.; LI, J.; CHEN, X.; WU, J.; WANG, P.; YE, J.; YAO, J. Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate. **Renewable Energy**, v. 36, n. 4, p. 1259-1265, 2011.

ZHANG, Q.; LI, Y.; LI, J.; MA, C. Dilute acid hydrolysis of cotton stalks and ethanol production from hydrolytic liquids. **International conference on Material for Renewable Energy & Environment**, p. 459-463, 2011. Disponível em < <http://ieeexplore.ieee.org> > Acesso em 05 de março de 2012. <http://www.sciencedirect.com>