



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

**PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DA CASCA DE UVA PARA LIBERAÇÃO
DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

DÉBORA CRISTINA MORAES NIZ DA SILVA

São José do Rio Preto – SP

Fevereiro - 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DA CASCA DE UVA PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

DÉBORA CRISTINA MORAES NIZ DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Co-orientadora: Prof^ª Dr^a Claudia Dorta

São José do Rio Preto – SP

Fevereiro - 2016

Niz da Silva, Débora Cristina Moraes.

Pré-tratamento e hidrólise da casca de uva para liberação de açúcares fermentescíveis / Débora Cristina Moraes Niz da Silva. -- São José do Rio Preto, 2016

109 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientador: Claudia Dorta

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Uva – Indústria – Subprodutos. 3. Resíduos agrícolas. 4. Hidrólise. 5. Açúcar – Fermentação. I. Silva, Débora Cristina Moraes Niz da. II. Bianchi, Vanildo Luiz Del. III. Dorta, Claudia. IV. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. V. Título.

CDU – 663.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DA CASCA DE UVA PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

DÉBORA CRISTINA MORAES NIZ DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Vanildo Luiz Del Bianchi

UNESP- São José do Rio Preto

Orientador

Profª Drª Ellen Silva Lago Vanzela

UNESP- São José do Rio Preto

Prof Dr Crispin Humberto Garcia-Cruz

UNESP- São José do Rio Preto

Drª Gisele Ferreira Bueno

UFRJ – Rio de Janeiro

Prof Dr Elias de Souza Monteiro Filho

UNESP - Araraquara

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2016

Dedico,

A minha mãe Mary pelo exemplo de vida, às minhas irmãs Elaine e Paula por todo carinho e apoio, aos meus sobrinhos Camila e Luis Marcelo que eu tanto amo e ao meu esposo Rafael que incondicionalmente apoiou todos os dias dessa jornada.

AMO VOCÊS!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que me sustentou até aqui e a Nossa Senhora que sempre me socorreu nos momentos de fraqueza.

Agradeço a minha mãe Mary, minhas irmãs Elaine e Paula, meus sobrinhos Camila e Luís Marcelo que são a raiz da minha existência, eu não conseguiria sem vocês.

Ao meu esposo Rafael, o amor da minha vida que em momento algum me desamparou, ao contrário, jamais permitiu que eu desistisse e me acompanhou durante todo o percurso, você é parte essencial de tudo isso!

Ao Prof Dr Vanildo Luiz Del Bianchi, obrigada por todos os ensinamentos, todo apoio, se eu for um terço do professor que você é, estarei realizada.

A Profª Drª Claudia Dorta, pela co-orientação neste trabalho, mais além, pela amizade de todos os dias, você é um exemplo para mim.

Aos meus sogros Fátima e Francisco e cunhados Renato, Taciano e Marcelo que torceram por mim.

À minha família, tios e primos, todos muito importantes e parte formadora da minha essência.

Às minhas amigas e companheiras Samara Murari, Elke Shiguematsu, Leticia Nagai, Marina Moro o caminho teria sido bem mais difícil sem vocês, obrigada por tudo.

Às minhas companheiras de trabalho com quem cada dia eu aprendi um pouco Juliana Gianonni, Marie Oshiwa, Alice Tanaka, Silvana Favoni.

Às minhas IC, dois presentes que recebi para trabalharem comigo Gabriela Bueno e Sulviene Vendrúsculo, muito obrigada.

A minha aluna de iniciação científica Karin Nunes do IBILCE e tantos outros orientados na graduação de Tecnologia em Alimentos da Fatec/Marília, foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos meus colegas de laboratório por toda a experiência compartilhada no dia a dia, Ariane, Maurício, Mariana, Arturo, Guilherme, Raphael, Jéssica, João.

Aos membros da banca professores Ellen, Crispin, Elias e Dr^a Gisele muito obrigada por todas as considerações e sugestões que contribuíram para melhorar a qualidade deste trabalho.

Ao professor Crispin por fornecer o CG para as análises de etanol das amostras.

Ao professor Mauricio Boscolo por fornecer o aparelho de ultrassom para as análises.

A vinícola Góes de São Roque por fornecer a matéria-prima para este trabalho.

A Fundação André Tosello – Coleção Tropical de Culturas que gentilmente cedeu os micro-organismos estudados neste trabalho.

Ao programa de Engenharia e Ciência de Alimentos da UNESP/IBILCE pela oportunidade.

A CAPES pela bolsa oferecida durante a realização de parte deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O Brasil tem recebido grande destaque no meio econômico por conta da alta produção do setor agroindustrial, como consequência torna-se um dos maiores produtores de resíduos. A reutilização destes compostos é importante para melhorar sua disposição no meio ambiente contribuindo para a redução da poluição ambiental, além disso, é uma forma de agregar valor aos subprodutos. A indústria vinícola tem grande interesse nestas tecnologias de reutilização, já que seus principais resíduos (casca e semente de uva) são de lenta decomposição prejudicando o meio ambiente. A casca da uva pode ser hidrolisada através do emprego de ácidos ou enzimas disponibilizando açúcares fermentescíveis, que podem ser transformados em uma série de bioprodutos. Este trabalho buscou estabelecer o melhor método de pré-tratamento e hidrólise, da casca de uva para disponibilizar os açúcares que podem ser fermentados pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*. Para tanto foi realizado o pré-tratamento químico ácido ou alcalino junto ao pré-tratamento físico em autoclave, micro-ondas ou ultrassom na casca da uva Cabernet Sauvignon. Em etapa posterior, para seleção da melhor condição de pré-tratamento e hidrólise foi aplicado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Também foi analisada a capacidade de consumo de açúcares do mosto hidrolisado de casca de uva pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*. A concentração dos açúcares foi medida através dos métodos de ADNS, xilose e glicose. Levando em consideração que ainda não existem na literatura muitos trabalhos envolvendo a casca de uva, com base nos resultados deste estudo o pré-tratamento alcalino em micro-ondas com 0,72% de NaOH por 13,5 minutos e a hidrólise ácida com 2,6% de H₂SO₄ por 13,5 minutos em autoclave foram os melhores métodos para a liberação de açúcares fermentescíveis com 10 g L⁻¹ de açúcares redutores, 3,3 g L⁻¹ de glicose e 6,7 g L⁻¹ de xilose. Com relação ao consumo de açúcar pelas leveduras em mosto do hidrolisado de casca de uva as leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* consumiram 100% da glicose disponível em 78% da xilose, com conversão de substrato a célula de $Y_{x/s}$ 0,72 g g⁻¹ para glicose $y_{x/s}$ 0,23 g g⁻¹ para xilose. A associação de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram potencial para a fermentação de mostos com glicose e xilose, podendo ser empregadas simultaneamente neste tipo de processo.

Palavras-chave: Pré-tratamentos. Hidrólise. Casca de uva. Açúcares fermentescíveis.

ABSTRACT

Brazil has been highlighted on the economic environment due to the high production of its agroindustrial sector; as a result, it becomes one of the major residue producers. The reutilization of these compounds is relevant to improve the environment disposal, contributing towards for the environmental pollution reduction. Moreover, it is a way of adding value for the by-products. The wine industry has a great interest on reutilization techniques, once its main residues (grape seeds and skin) has a slow decomposition, which damages the environment. The grape skin can be hydrolyzed with acids or enzymes, making available fermentable sugars that can be transformed in a number of byproducts. This work sought to establish the best pre-treatment and hydrolysis method for the grape skin to provide the sugars that can be fermented for the *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Pachysolen tannophilus* yeasts. For this purpose, it was applied the acid or alkaline chemical pre-treatment along with the physic pre-treatment in autoclave, microwave or ultrasound on the Cabernet Sauvignon grape skin. Afterwards, for the pre-treatment and hydrolysis best condition selection, it was applied the Rotatable Central Composite Design (RCCD). It was also analyzed the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Pachysolen tannophilus* consumption capacity of the grape skin hydrolysed must sugars. The sugars concentration was measured through the ADNS methods, xylose and glucose. Taking into account the lack of grape skin works on the literature, based on the results of this work the alkaline pre-treatment on microwave with 0,72% of NaOH for 13,5 minutes and the acid hydrolysis with 2,6% of H₂SO₄ for 13,5 minutes in autoclave were the best methods for the fermentable sugars release with 10 g L⁻¹ of reducing sugars, 3,3 g L⁻¹ of glucose and 6,7 g L⁻¹ of xylose. With regard to sugar consumption by the yeasts in the must of the grape skin hydrolyzate, the yeasts *Pichia stipitis* CCT 2617 and *Saccharomyces cerevisiae* consumed 100%w of the glucose available in 78% of the xylose, with conversion of substrate the cell of $Y_{x/s}$ 0,72 g g⁻¹ for glucose $y_{x/s}$ 0,23 g g⁻¹ for xylose. The yeast association between *Pichia stipitis* CCT 2617 and *Saccharomyces cerevisiae* showed potencial for the must fermentation with glucose and xylose, which can be simultaneously applied in this kind of process.

Keywords: Pretreatments. Hydrolysis. Grape skins. Fermentable sugars.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 A uva: <i>Vitis vinífera</i> L.	4
3.2 Estruturas lignocelulósicas	4
3.2.1 Celulose.....	5
3.2.2 Hemicelulose.....	6
3.2.3 Lignina.....	7
3.3 Pré-tratamentos	8
3.3.1 Pré-tratamento químico.....	10
3.3.1.1 Pré-tratamento com ácidos diluídos	10
3.3.1.2 Pré-tratamento alcalino	11
3.3.2 Pré-tratamento físico	11
3.3.2.1 Micro-ondas	12
3.3.2.2 Autoclave	13
3.3.2.3 Ultrassom	13
3.4 Hidrólise ácida	13
3.4.1 Compostos tóxicos derivados da hidrólise ácida	15
3.5 Fermentação dos açúcares derivados da hidrólise	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Parte 1 – Obtenção de açúcares fermentescíveis da casca de uva Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida aplicando o planejamento fatorial 2 ²	18
4.1.1 Coleta do material.....	18
4.1.2 Preparo do material.....	18
4.1.3 Pré-hidrólise alcalina	18
4.1.4 Hidrólise ácida.....	19

4.2 Parte 2 – Pré-tratamento ácido ou alcalino em autoclave e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon	21
4.2.1 <i>Matéria-prima e reagentes</i>	22
4.2.2 <i>Pré-tratamento ácido ou alcalino</i>	22
4.1.3 <i>Hidrólise ácida.....</i>	22
4.3 Parte 3 Avaliação dos pré-tratamentos físicos em autoclave, micro-ondas ou ultrassom com pré-tratamentos ácidos ou alcalinos e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon	23
4.3.1 <i>Coleta e preparo do material.....</i>	24
4.3.2 <i>Pré-tratamentos</i>	24
4.3.2.1 <i>Autoclave</i>	24
4.3.2.2 <i>Micro-ondas</i>	24
4.3.2.3 <i>Ultrassom</i>	25
4.3.3 <i>Hidrólise ácida.....</i>	26
4.4 Parte 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para pré-tratamento alcalino em micro-ondas.	26
4.4.1 <i>Coleta e preparo do material.....</i>	26
4.4.2 <i>Delineamento experimental</i>	26
4.4.3 <i>Hidrólise ácida.....</i>	27
4.5 Parte 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para hidrólise ácida em autoclave.....	27
4.5.1 <i>Coleta e preparo do material.....</i>	27
4.5.2 <i>Delineamento experimental</i>	28
4.6 Parte 6 – Fermentação de mostos sintéticos contendo glicose e xilose.....	29
4.6.1 <i>Manutenção da Cultura Estoque.....</i>	29
4.6.2 <i>Padronização do Inóculo</i>	29
4.6.3 <i>Fermentação.....</i>	30
4.7 Parte 7 – Pré-tratamento e hidrólise da casca de uva e fermentação do hidrolisado	30
4.7.1 <i>Pré-tratamento e hidrólise da casca de uva</i>	30

4.7.2 Remoção dos compostos tóxicos e concentração do mosto.....	30
4.7.3 Fermentação do hidrolisado	31
4.8 Métodos analíticos	31
4.8.1 Concentração de açúcar redutor.....	31
4.8.2 Concentração de Xilose.....	31
4.8.3 Concentração de Glicose.....	32
4.8.4 Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica a 600 nm.....	33
4.8.5 Medida de Crescimento	33
4.8.6 Determinação dos parâmetros de hidrólise	34
4.8.7 Etanol.....	34
4.8.7.1 Cálculos relacionados à produção etanólica.....	34
4.9 Análise estatística	35
4.9.1 Forma de análise dos resultados – Parte 1, 2, 3.....	35
4.9.2 Forma de análise dos resultados- Planejamento DCCR – Parte 1, 4 e 5.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Parte 1 – Açúcares fermentescíveis obtidos da casca de uva Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e bagaço de cana após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida.....	37
5.2 Parte 2 – Açúcares obtidos de pré-tratamentos ácidos ou alcalinos em autoclave e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon.....	49
5.2.1 Pré-tratamento ácido e hidrólise ácida.....	49
5.2.2 Pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida	53
5.3 Parte 3 Pré-tratamento da casca de uva utilizando como pré-tratamentos físicos autoclave, micro-ondas ou ultrassom.....	56
5.3.1 Açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em autoclave associado à hidrólise ácida.....	56
5.3.2 Açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em micro-ondas associado à hidrólise ácida.....	59
5.3.3 Análise de açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em ultrassom mais hidrólise ácida.....	62

5.4 Parte 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para pré-tratamento alcalino em micro-ondas.	65
5.4.1. <i>Variável resposta Açúcares Redutores (AR) (Parte 4)</i>	65
5.4.2 <i>Variável resposta glicose (Parte 4)</i>	66
5.4.3 <i>Variável resposta xilose (Parte 4)</i>	67
5.5 Parte 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para hidrólise ácida em autoclave	70
5.5.1 <i>Variável resposta açúcares redutores (AR) (Parte 5)</i>	70
5.5.2 <i>Variável resposta glicose (Parte 5)</i>	71
5.5.3 <i>Variável resposta xilose (Parte 5)</i>	72
5.6 Parte 6 – Fermentação de mostos sintéticos contendo glicose e xilose	75
5.6.1 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura Pichia stipitis CCT 2617</i>	75
5.6.2 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras Pichia stipitis CCT 2617 e Saccharomyces cerevisiae</i>	76
5.6.3 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura Pachysolen tannophilus CCT 1891</i>	78
5.6.4 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras Pachysolen tannophilus CCT 1891 e Saccharomyces cerevisiae</i>	80
5.7 Parte 7 – Parâmetros cinéticos e fermentativos de leveduras em mostos de hidrolisado de casca de uva	83
5.7.1 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura Pichia stipitis CCT 2617</i>	83
5.7.2 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras Pichia stipitis CCT 2617 e Saccharomyces cerevisiae</i>	84
5.7.3 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura Pachysolen tannophilus CCT 1891</i>	86
5.7.4 <i>Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras Pachysolen tannophilus CCT 1891 e Saccharomyces cerevisiae</i>	88
6. CONCLUSÃO	90
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	90

8. APÊNDICE A	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos	5
Tabela 2 - Métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas	9
Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial 2 ² para os testes de pré-hidrólise alcalina	19
Tabela 4 - Valores reais e níveis dos fatores aplicados na pré-hidrólise alcalina.....	19
Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial 2 ² para os testes de hidrólise ácida.....	20
Tabela 6 - Valores reais e níveis dos fatores aplicados na hidrólise ácida	20
Tabela 7 - Concentração do reagente e tempo de reação nos ensaios utilizando pré-tratamento ácido ou alcalino para hidrólise ácida	22
Tabela 8 - Concentração dos reagentes e tempos de tratamento do experimento 3	24
Tabela 9 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes (Parte 4)	26
Tabela 10 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional (Parte 4).....	27
Tabela 11 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes (Parte 5)	28
Tabela 12 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional (Parte 5).....	28
Tabela 13 - Composição do meio de cultivo utilizado para padronização do inóculo das leveduras e meio fermentativo.....	29
Tabela 14 - Protocolo experimental para análise da concentração de xilose das amostras	32
Tabela 15 - Protocolo experimental para determinação das concentrações de glicose nas amostras	33
Tabela 16 - Concentração de glicose e xilose da pré-hidrólise alcalina da uva Cabernet Franc e do bagaço de cana-de-açúcar	37
Tabela 17 - Concentração de glicose e xilose da pré-hidrólise alcalina da uva Cabernet Sauvignon e do bagaço de cana-de-açúcar	38
Tabela 18 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc	39
Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc	39
Tabela 20 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc	40
Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc	40
Tabela 22 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon	41
Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon	42

Tabela 24 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon	43
Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon	43
Tabela 26 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise do bagaço de cana.....	44
Tabela 27 – Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise do bagaço de cana.....	44
Tabela 28 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise do bagaço de cana.....	45
Tabela 29 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise do bagaço de cana.....	45
Tabela 30 - Concentração de glicose e xilose da hidrólise ácida da uva Cabernet Franc não pré-hidrolisada.	47
Tabela 31 - Concentração de glicose e xilose da hidrólise ácida da uva Cabernet Sauvignon não pré-hidrolisada.	48
Tabela 32 - Concentração de açúcares redutores g L ⁻¹ obtidos após pré-tratamento ácido e hidrólise ácida.	49
Tabela 33 - Concentração de açúcares redutores g L ⁻¹ obtidos após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida	53
Tabela 34 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em autoclave seguido de hidrólise ácida	57
Tabela 35 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em micro-ondas seguido de hidrólise ácida.....	60
Tabela 36 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em ultrassom seguido de hidrólise ácida	63
Tabela 37 - Efeitos e interações calculadas para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 4)	65
Tabela 38 - Análise de variância (ANOVA) para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 4)	65
Tabela 39 - Efeitos e interações calculadas para a variável glicose (Parte 4)	66
Tabela 40 - Análise de variância (ANOVA) para a variável repostas glicose (Parte 4)	67
Tabela 41 - Efeitos e interações calculadas para a variável xilose (Parte 4)	68
Tabela 42 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta xilose (Parte 4)	68
Tabela 43 - Efeitos e interações calculadas para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 5)	70

Tabela 44 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta açúcares redutores (AR) (Parte 5)	70
Tabela 45 - Efeitos e interações calculadas para a variável glicose (Parte 5)	71
Tabela 46 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta glicose (Parte 5)	72
Tabela 47 - Efeitos e interações calculadas para a variável xilose (Parte 5)	73
Tabela 48 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta xilose (Parte 5)	73
Tabela 49 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pela levedura <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 durante as 48 horas de fermentação	75
Tabela 50 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante as 48 horas de fermentação	77
Tabela 51 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pela levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891 durante as 48 horas de fermentação.....	79
Tabela 52 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante as 48 horas de fermentação	81
Tabela 53 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado por <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 durante 24 horas.	83
Tabela 54 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante 24 horas.	85
Tabela 55 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pela levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891 durante 24 horas.	87
Tabela 56 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante 24 horas.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia linear de glicose formada por vários biopolímeros de celobiose.....	6
Figura 2 - Componentes da fração hemicelulose	7
Figura 3 - Estrutura do material lignocelulósico: celulose, hemicelulose e lignina.....	8
Figura 4 - Três principais precursores monoméricos da lignina: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico	8
Figura 5 - Efeitos do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica	10
Figura 6 - Reação de hidrólise ácida da celulose	14
Figura 7 - Fluxograma de execução do experimento Parte 2	21
Figura 8 - Fluxograma de execução do experimento Parte 3	23
Figura 9 - Micro-ondas doméstico utilizado no experimento	25
Figura 10 - Equipamento de ultrassom utilizado no experimento.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Franc	Erro! Indicador não definido.
Gráfico 2 – Concentração da xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Franc	41
Gráfico 3 – Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon	42
Gráfico 4 – Concentração da xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon	43
Gráfico 5 - Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida do bagaço de cana	45
Gráfico 6 - Concentração da xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida do bagaço de cana	46
Gráfico 7 - Concentração de glicose após o pré-tratamento com H_3PO_4 e hidrólise ácida	50
Gráfico 8 - Concentração de xilose após o pré-tratamento com H_3PO_4 e hidrólise ácida	51
Gráfico 9 - Concentração de glicose após o pré-tratamento com NaOH e hidrólise ácida	54
Gráfico 10 - Concentração de xilose após o pré-tratamento com NaOH e hidrólise ácida	55
Gráfico 11 - Concentração de açúcares redutores (AR) $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave	56
Gráfico 12 - Concentração de glicose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave	58
Gráfico 13 - Concentração de xilose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave	59
Gráfico 14 - Concentração de açúcares redutores (AR) $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas	60
Gráfico 15 - Concentração de glicose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas	61
Gráfico 16 - Concentração de xilose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas	61
Gráfico 17 - Concentração de açúcares redutores (AR) $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em ultrassom	62
Gráfico 18 - Concentração de glicose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em ultrassom	63
Gráfico 19 - Concentração de xilose $g L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em ultrassom	64

Gráfico 20 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta açúcares redutores (AR) em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento	66
Gráfico 21 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta glicose em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento	67
Gráfico 22 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta xilose em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento	69
Gráfico 23 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta açúcar redutor em função da concentração de H ₂ SO ₄ e tempo de tratamento	71
Gráfico 24 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta glicose em função da concentração de H ₂ SO ₄ e tempo de tratamento	72
Gráfico 25 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta xilose em função da concentração de H ₂ SO ₄ e tempo de tratamento	74
Gráfico 26 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pela levedura <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 durante as 48 horas de fermentação	76
Gráfico 27 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante as 48 horas de fermentação	78
Gráfico 28 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pela levedura <i>Pachysolentannophilus</i> CCT 1891durante às 48 horas de fermentação.....	80
Gráfico 29 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras <i>Pachysolen tannophilus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante as 48 horas de fermentação	81
Gráfico 30 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado por <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 durante 24 horas	84
Gráfico 31 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante 24 horas.....	86
Gráfico 32 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pela levedura <i>Pachysolentannophilus</i> CCT 1891 durante 24 horas.	87
Gráfico 33 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante 24 horas.....	89

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção agrícola gerando ao final dos processos grande quantidade de resíduos. A procura por novos métodos de reaproveitamento vem aumentando justamente com o propósito de diminuir a poluição ambiental através de síntese de novos produtos (ALZATE; TORO, 2006; HU; WEN, 2008).

A indústria vinícola tem grande interesse nestas tecnologias já que um dos seus resíduos mais abundantes é a casca da uva, um material de lenta decomposição no meio ambiente (BAIL et al., 2008; SPIGNO et al., 2008). O seu reaproveitamento pode ser efetuado através da produção de farinha de semente e casca da uva que apresenta propriedades importantes como antioxidantes (ABE et al., 2007) e recuperação de compostos fenólicos (ARVANITOYANNIS et al., 2006; CRUZ et al., 2013), além da possibilidade da produção de bioetanol a partir da celulose e hemicelulose presente nesta biomassa lignocelulósica (SPIGNO et al., 2008; PROZIL et al., 2012).

A produção de bioetanol é uma das alternativas que tem o propósito de substituir combustíveis fósseis consequentemente contribuindo para a diminuição do efeito estufa (CHENG et al., 2008; IMAMOGLU, SUKAN, 2014). A biomassa que vem de resíduos agroindustriais é um dos tipos de compostos energéticos mais utilizados na obtenção deste biocombustível.

Para a transformação destes resíduos em bioetanol são necessárias duas etapas: a hidrólise dos polissacarídeos contidos nos complexos lignocelulósicos em açúcares mais simples e a posterior fermentação desses açúcares (ROSSELL et al., 2005; KIIPPER, 2009; SU et al., 2012).

Os materiais lignocelulósicos a serem hidrolisados são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina (MOSIER et al., 2005). A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos formados a partir de hexoses e pentoses que podem ser hidrolisados a monossacarídeos (glicose, xilose) e eventualmente fermentados a etanol. A lignina não pode ser convertida em etanol, porém seu emprego no processo como fonte energética é recomendável (HASUNUMA et al., 2013; COTANA et al., 2014).

Existem várias tecnologias de hidrólise, incluindo a hidrólise ácida, que compreende a utilização de ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido acético e ácido peracético em conjunto com tratamento térmico (CUZENS; MILLER, 1997; TEIXEIRA et al., 1999; AGUILAR et al., 2002; GÁMEZ et al., 2006). O grande problema deste método é a geração de compostos inibitórios (LASER et al., 2002).

Alguns estudos mais recentes apontam que a utilização de pré-tratamentos pode favorecer o processo de hidrólise (MENON; RAO, 2012; PITARELO et al., 2012). Várias são as possibilidades de pré-tratamentos com diferentes rendimentos de glicose e xilose, tais como tratamentos com ácidos (WU; HUANG; SHIH, 2014), álcalis, autoclave (LÓPEZ-LINARES et al., 2013), micro-ondas (HU; WEN, 2008), ultrassom (WERLE et al., 2013; LUNELLI et al., 2014), cujo objetivo é remover a lignina e desestruturar as fibras, facilitando o ataque da hidrólise posterior (SAHA, 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Após o processo de hidrólise ocorre a fermentação. A transformação da glicose em etanol é um processo completamente estabelecido. Não existe micro-organismo mais apropriado que a levedura *Sacharomyces cerevisiae* que, através de seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica. Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados, a fermentação acontece sem maiores problemas (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; DORTA et al., 2006).

Quanto à fermentação das pentoses, poucos micro-organismos possuem a capacidade de fermentar estas a etanol (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985, HERRERA et al., 2003). Três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica das pentoses: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* (DU PREEZ et al., 1986; SÁNCHEZ et al., 2002) e *Pachysolen tannophilus* (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985; BRAVO et al., 2002).

Esta é, portanto, uma alternativa promissora para realizar o reaproveitamento dos resíduos dos processos de vinificação. Desta forma, este trabalho buscou utilizar diferentes metodologias de pré-tratamento e hidrólise para melhoramento da obtenção de açúcares fermentescíveis para posteriormente fazer a transformação em bioetanol.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar a influência de pré-tratamentos químicos (ácido e alcalino) e pré-tratamentos físicos (micro-ondas, autoclave e ultrassom) sobre a eficiência da hidrólise ácida da casca da uva Cabernet Sauvignon e estudar a capacidade de consumo dos açúcares existentes na casca da uva hidrolisada por diferentes leveduras.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a eficiência de obtenção de açúcares fermentescíveis de casca de uva Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e bagaço de cana após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida utilizando o planejamento fatorial 2^2 .
- Testar durante o pré-tratamento químico da casca de uva Cabernet Sauvignon o efeito de diferentes concentrações de ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, em autoclave, seguida de hidrólise ácida na liberação de açúcares fermentescíveis.
- Comparar a ação dos pré-tratamentos físicos: autoclave, micro-ondas e ultrassom seguidos de pré-tratamentos ácidos e alcalinos e hidrólise ácida na casca de uva para obtenção de açúcares fermentescíveis.
- Após a seleção do melhor pré-tratamento, melhorar as condições de processo através de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).
- Melhorar as condições da hidrólise ácida da casca de uva através de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).
- Verificar a capacidade de utilização dos açúcares obtidos do hidrolisado através de fermentação pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (comercial Fleishmann), *Pichia stipitis* CCT2617 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A uva: *Vitis vinífera* L.

A videira *Vitis vinífera* L. (Cabernet Sauvignon ou Franc) é originária de Bordeaux, França, sendo uma das uvas viníferas mais cultivadas no Brasil (GIOVANNINI, 2001; POMMER et al., 2003; DETONI et al., 2007). Tem elevada qualidade para vinificação, sabor herbáceo e destina-se à elaboração de vinho tinto de guarda (requer amadurecimento e envelhecimento) ou para ser consumido jovem (RIZZON; MIELE, 2002).

Apresenta os cachos cilíndricos e longos, pesando em média 130 a 170 g, sendo as bagas pequenas, esféricas e pretas (POMMER et al., 2003; DETONI et al., 2007), com teores de açúcar entre 16 e 18 °Brix (GIOVANNINI, 2001). Embora tenha sido introduzida no Brasil em 1921, foi somente depois de 1980 que houve incremento de seu plantio na Serra Gaúcha e na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul (RIZZON; MIELE, 2002).

Segundo o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIM), somente as vinícolas do estado do Rio Grande do Sul processaram, no ano de 2014, 66 milhões de kg de uvas viníferas, dentre elas a variedade Cabernet (*Vitis vinífera* L.). Levando em consideração que o bagaço (casca, engaço e semente) representa de 10 a 15% em peso da matéria-prima inicial e que ainda contém na sua matriz açúcares (ARVANITOYANNIS et al., 2006) que podem ser disponibilizados para a conversão em diversos produtos, esta biomassa desperta um grande interesse para o reaproveitamento (PROZIL et al., 2012a; PROZIL et al., 2012b; MENDES et al., 2013).

3.2 Estruturas lignocelulósicas

Os materiais lignocelulósicos possuem um alto teor de carboidrato (cerca de 70%) que podem ser muito utilizados em diversos processos tecnológicos (VÁSQUEZ, 2007).

De acordo com Silva (1995) essas moléculas estão dispostas de forma complexo sendo, especificamente, miofibrilas de celulose, envolvida em uma matriz amorfa de polioses e envolta externamente por uma camada de lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural de proteção do vegetal ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas, e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos. Segundo Kuhad e Singh

(1993), há também, na composição da massa total do bagaço, os extrativos, gomas, amidos, alcalóides, resinas e óleos essenciais.

A complexa estrutura vegetal, originada por seus macro e micro constituintes, oferece uma gama de produtos com potencial para agregação de valor à cadeia produtiva. O maior entendimento da estrutura vegetal e dos principais constituintes – celulose, hemicelulose e lignina – se faz necessário para se atingir o objetivo de separação seletiva. A Tabela 1 mostra a constituição lignocelulósica de alguns materiais. Dentre os diversos produtos, a glicose obtida da celulose pode ser usada como matéria-prima para a produção de etanol, enquanto açúcares com 5 carbonos, provenientes da fração de hemiceluloses, podem ser usados para a produção de etanol, xilitol e ácidos orgânicos por exemplo. Por sua vez, a lignina presente nos tecidos vegetais é uma fonte em potencial para a produção em larga escala de diferentes compostos fenólicos (KLASS, 1998; MOSIER et al., 2005).

Tabela1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos

Materiais	Celulose (%)	Hemicelulose	Lignina (%)	Cinzas (%)
Lignocelulósicos		(%)		
Forragem de milho	38 - 40	28	7 - 21	3,6 – 7
Fibra de coco	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45	2,7 - 10,2
Fibra de bagaço	32 - 48	19 - 24	23 - 32	1,5 – 5
Fibra de bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10	4,7
Palha de trigo	33 - 38	26 - 32	17 - 19	6 – 8
Palha de arroz	28 - 36	23 - 28	12 - 14	14 – 20
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19	2 – 7
Bagaço de uva	12 – 15	26 – 29	32 – 35	5 - 7

Fonte: Adaptado de REDDY; YANG, 2005; EGÜÉS et al.; 2013

3.2.1 Celulose

A celulose é o principal e o mais abundante componente dentre os materiais lignocelulósicos, que varia de 35 – 50% a sua concentração em diferentes tipos de matérias-primas (KESHWANI, 2009). Sua estrutura é composta por homopolímeros e apresenta estrutura linear formada por unidades de anidroglicopirranose β -D-glicopirranose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) (PITARELO et al., 2012). Quando se tem duas unidades

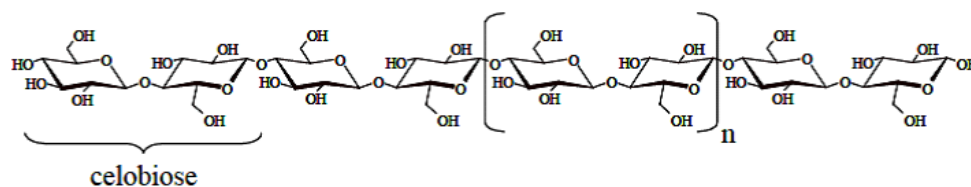
de glicose unidas por ligações β (1-4) e há repetição do biopolímero de celulose é chamado de celobiose (Figura 1) (VÁSQUEZ, 2007).

Em sua estrutura molecular, a celulose apresenta regiões ordenadas que são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular sendo regiões cristalinas e amorfas, respectivamente (JARDINE, 2009). A região cristalina possui configuração mais ordenada, pois a sua formação é por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e força de Van der Waals, e a região amorfa, além de menos ordenada e de apresentar maior área superficial, torna-a mais suscetível a hidrólise (SILVA, O. 2010).

A molécula de celulose é insolúvel em água, ácidos e álcalis sendo solúvel em solução amoniacal de hidróxido cúprico e somente é totalmente hidrolisada por enzimas celulasas (PARISI, 1989).

Mendes et al. (2013) apontam que a celulose contida na casca de uva variedade Touriga Nacional é relativamente baixa (20,8%) quando comparada ao engaço da mesma variedade estudado por Prozil et al. (2012).

Figura 1 - Cadeia linear de glicose formada por vários biopolímeros de celobiose



Fonte: SILVA, O. 2010

3.2.2 Hemicelulose

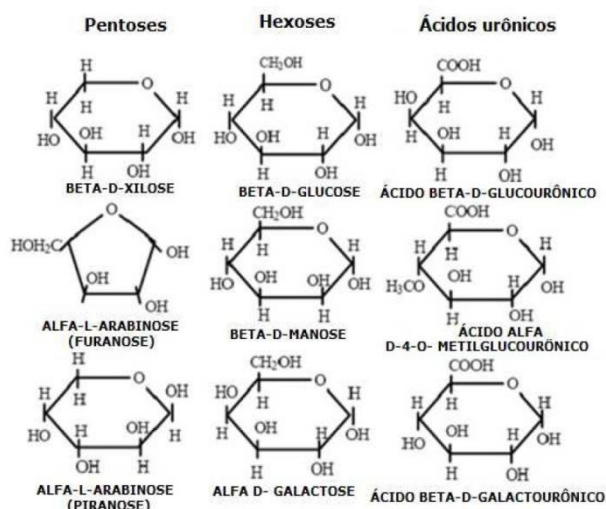
A porção de hemicelulose é a segunda de maior abundância no material lignocelulósico (15% - 45%) e sua estrutura é de cadeias ramificadas, em que se constituem de aldopentoses, como xilose e arabinose, e de aldohexoses, como glicose, manose e galactose (Figura 2). Devido a variadas ligações e ramificações, há a presença de uma alta complexidade de estrutura hemicelulósica e de suas conformações (SILVA, N. 2010). As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose proporcionando elasticidade e impedindo que as microfibrilas se toquem. São mais solúveis que a celulose podendo ser isoladas por extração alcalina (STAMBUK et al., 2008).

Quanto à sua estrutura molecular, a hemicelulose é mais facilmente hidrolisada por não haver zonas cristalinas em sua estrutura, porém, o processo de fermentação das pentoses não é consideravelmente desenvolvido como o da glicose (NEUREITER et al., 2002).

Dentre as aldopentoses presentes, a xilose é a mais importante e de maior quantidade dentre elas. É formada por complexos de carboidratos poliméricos como a xilana (polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,40) (SILVA, O. 2010).

Com relação à hemicelulose da casca de uva, Mendes et al. (2013) encontraram 21% e Egüés et al. (2013) relatam 26,43% de hemicelulose encontrada na casca de uva.

Figura 2 - Componentes da fração hemicelulose



Fonte: LEHNINGER, 2014.

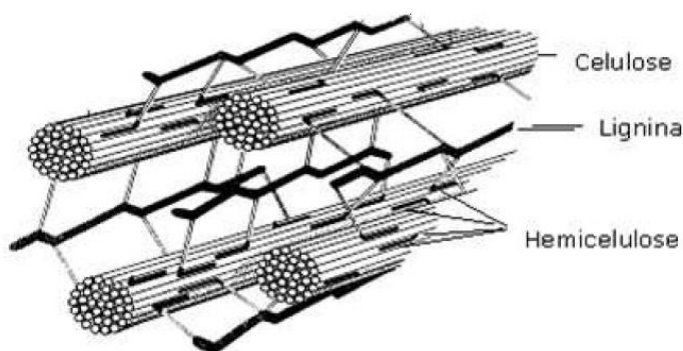
3.2.3 Lignina

A lignina está presente em 10% a 20% do material lignocelulósico (COSTA, 2011). Encontra-se ligada à parede celular em que se entrelaça a hemicelulose formando uma fibra que envolve a celulose (Figura 3) (VÁSQUEZ, 2007).

Ela age como material adesivo, agente de enrijecimento e impede degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (READING et al., 2003). Em sua estrutura tridimensional, há presença de material polifenólico amorfo com três principais precursores monoméricos: os alcoóis coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (Figura 4).

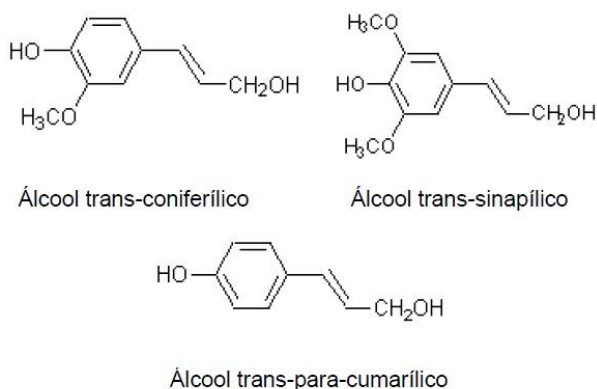
Por possuir vários tipos de ligações químicas estáveis como C-C, aril-éter e diarílicas, e sendo as mais abundantes: β -O-4 e α -O-4, β -5, β -1, 5-5, β - β e β -O-5, a estrutura da lignina torna-se bastante complexa (PITARELO et al., 2012). No reino vegetal encontra-se a lignina em muitas espécies de plantas, mas sua constituição difere de uma para a outra (JARDINE, 2009).

Figura 3 -Estrutura do material lignocelulósico: celulose, hemicelulose e lignina



Fonte: COSTA, 2011

Figura 4 - Três principais precursores monoméricos da lignina: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico



Fonte: SILVA, N.2010

3.3 Pré-tratamentos

O pré-tratamento consiste na separação da lignina que está envolvendo a celulose e a hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade dos materiais para que haja um maior rendimento em açúcares fermentescíveis (PASQUINI et al., 2005; COSTA, 2011).

Existem várias formas de pré-tratamento com diferentes rendimentos de glicose e xilose. Os mais utilizados são os pré-tratamentos ácidos, álcali, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida (AFEX) e hidróxido de sódio para a desestruturação lignocelulósica na obtenção de combustíveis renováveis (PITARELO et al., 2012). Mas há também outros tipos de pré-tratamentos (Tabela 2), como físicos: moagem, micro-ondas; e biológicos: decomposição microbiana de lignina (RODRIGUES, 2010).

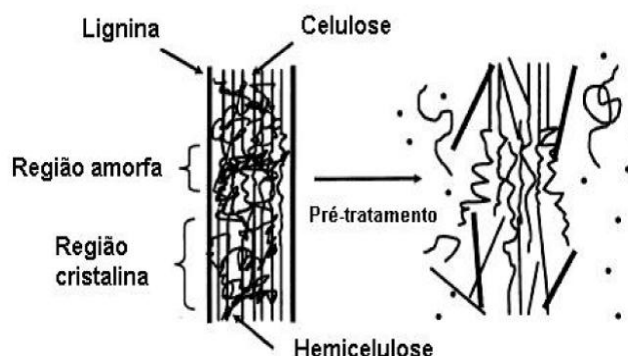
Tabela 2 - Métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas

Métodos físicos	Métodos Químicos	Métodos biológicos	Métodos Combinados
Vapor	Ozonólise	Pré-tratamento por fungos (de decomposição branca ou parda)	Explosão a vapor
Radiação	Hidrólise ácido diluído (H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , H_3PO_4)	Pré-tratamento Bioorganosolv	por Hidrotérmico
Moinho de bola	Hidrólise ácido concentrado (H_2SO_4)		SO_2 e vapor
Moinho martelo	Ácido acético		NO_2 e irradiação
Barra giratória	Hidrólise alcalina ($NaOH$, $Ca(OH)_2$)		Alcalino e moinho de bolas
Umidificação	Amônia		Amônia e vapor (AFEX)
Água quente	SO_2		Explosão e CO_2
Pirólise	Deslignificação oxidativa		
	Processo organosolv		

Fonte: Adaptado de SADDLER; RAMOS; BREUIL, 1993; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008.

Após a utilização de pré-tratamentos são obtidas modificações na estrutura da biomassa (Figura 5), porém as modificações são diferentes de acordo com a matéria-prima utilizada. As tecnologias mudam conforme as biomassas que irão sofrer a ação do pré-tratamento (MARGEOT et al., 2009).

Figura 5 - Efeitos do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica



Fonte: DA SILVA, 2010

3.3.1 Pré-tratamento químico

De acordo com Menon; Rao (2012), os pré-tratamentos químicos originalmente foram desenvolvidos e têm sido extensivamente usados na indústria de papel para a deslignificação de materiais celulósicos. Os principais objetivos eram de melhorar a biodegradabilidade de celulose por remoção da lignina e a um grau menor diminuir o grau de polimerização (DP) e da cristalinidade da celulose. O pré-tratamento químico é a técnica mais estudada dentre as categorias pré-tratamento e normalmente incluem: ácido, álcalis, ácidos orgânicos, água quente e líquidos iônicos (SILVERSTAIN et al., 2007).

3.3.1.1 Pré-tratamento com ácidos diluídos

São utilizadas baixas concentrações do reagente (0,05 – 5%) e temperatura (160 °C a 220°C) (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008), sendo que o mais utilizado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4) visando diminuir a formação de produtos de degradação, porém outros ácidos também têm sido estudados, tais como ácido clorídrico (HCl) (WANG et al., 2010), o ácido fosfórico (H_3PO_4) (ZHANG et al., 2007; MARZIALETTI et al., 2008) e ácido nítrico (HNO_3) (HIMMEL et al., 1997).

Em geral, o pré-tratamento deve promover altos rendimentos do produto em uma subsequente operação de hidrólise enzimática e fermentação, trazendo redução de custos ao processo. Recentemente, foi demonstrado que a pré-hidrólise com ácido diluído pode alcançar elevadas taxas de reações em curto espaço de tempo e melhorar significativamente a hidrólise de celulose (XIANG et al., 2003). No entanto, as condições de operação devem ser

adaptadas à composição estrutural das diversas fontes de biomassa, de acordo com o produto a ser obtido (MENON; RAO, 2012).

A utilização de ácidos pode causar aspectos negativos como corrosão dos equipamentos. Dessa forma é necessária a utilização de materiais anticorrosivos que são mais caros, mas a vantagem é a não utilização de enzimas hemicelulolíticas na etapa da hidrólise trazendo economia para o processo (DA SILVA, 2010).

3.3.1.2 Pré-tratamento alcalino

Os principais reagentes utilizados são: hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio e óxido de cálcio (SADDLER; RAMOS; BREUIL, 1993). A utilização de um composto alcalino provoca a degradação do éster e cadeias laterais glicosídicas resultantes em alteração estrutural da lignina, descristalização parcial da celulose (CHENG et al., 2008; McINTOSH; VANCOV, 2010), e solvatação parcial de hemicelulose (McINTOSH; VANCOV, 2010; SILLS; GOSSETT, 2011).

O hidróxido de sódio tem sido extensivamente estudado, com o objetivo de romper a estrutura de lignina, aumentando a acessibilidade para as enzimas de celulose e hemicelulose (MacDONALD et al., 1983; ZHU; WAN; LI, 2010). As condições de pré-tratamento alcalino são geralmente menos severas do que outros pré-tratamentos. Ela pode ser realizada em temperatura ambiente, mas os tempos são mais longos do que quando são utilizadas temperaturas mais elevadas.

O processo envolve a imersão da biomassa em soluções alcalinas a uma temperatura-alvo durante certo período de tempo, posteriormente ocorre a neutralização para remover lignina e inibidores (sais, ácidos fenólicos, furfural, e aldeídos) sendo que esta etapa é necessária antes da hidrólise enzimática (MENON; RAO, 2012). Durante o pré-tratamento há perda de parte do reagente que é convertido em sais que se incorporam à biomassa durante a etapa. A eficiência do álcali depende do conteúdo de lignina presente na biomassa (DA SILVA, 2010).

3.3.2 Pré-tratamento físico

A utilização de pré-tratamentos físicos aumenta a área de superfície e dos poros da biomassa, diminui a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose. Alguns desses pré-tratamentos como a moagem e a irradiação melhoram a hidrólise enzimática e a

biodegradabilidade dos materiais lignocelulósicos deixando mais acessíveis para a ação das enzimas (DA SILVA, 2010). Outras maneiras de pré-tratamentos físicos são encontradas e muito utilizadas para o mesmo fim de deslignificação obtendo melhores resultados na hidrólise sendo que a explosão a vapor e a termo-hidrólise também apresentam vantagens e desvantagens em seu uso (SUN e CHENG, 2002; SILVA, O. 2010).

O pré-tratamento por irradiação pode ser por raio gama, feixes de elétrons ou micro-ondas que clivam as ligações β -1,4 degradando as fibras de celulose e diminuindo peso molecular podendo chegar até a celobiose. Sua desvantagem de uso é o preço e a dificuldade de sua introdução em escala industrial (RODRIGUES, 2010).

3.3.2.1 Micro-ondas

Entre a faixa do espectro eletromagnético e o infravermelho encontra-se a frequência utilizada pelos micro-ondas domésticos e industriais que está dentro da faixa de 900 MHz e 2,45GHz. A frequência de 2,45 GHz não é boa para induzir reações químicas, mas se o material exposto contiver em sua estrutura moléculas polares e íons a radiação causa uma aceleração no processo. Além disso, a utilização das micro-ondas traz como vantagem a redução do investimento inicial, uniformidade e seletividade no processo, além da possibilidade de iniciar e interromper a reação instantaneamente (KESHWANI, 2009; RODRIGUES, 2010). Já a moagem, ao contrário das micro-ondas, exige alta energia para seu funcionamento sendo considerado desfavorável seu uso e consequentemente pouco explorado (SILVA, A. 2010).

A sua utilização em material lignocelulósico cria um campo eletromagnético interparticular, gerando calor de forma rápida e direta fazendo com que haja sua ruptura, ao contrário da forma de calor por condução e convecção que é feita a transferência do calor superficial (DE LA ROZ et al., 2005; HU; WEN, 2008).

Somente com o pré-tratamento por micro-ondas não há efeito significativo na estrutura lignocelulósica, precisando assim de um componente polar ou iônico como compostos alcalinos (NaOH , Ca(OH)_2 e Na_2CO_3) e ácidos (H_2SO_4) (PALMAROLA-ADRADOS et al., 2005; ZHU et al., 2005; ZHU et al., 2006; HU; WEN, 2008; KESHWANI, 2009).

3.3.2.2 Autoclave

A autoclavagem é um tratamento térmico bastante utilizado nas tecnologias de pré-tratamento e hidrólise da biomassa. Consiste em manter o material a ser hidrolisado a uma temperatura elevada e sob pressão, por um período de tempo que deve ser previamente estabelecido. O processo inclui ciclos de compressão e descompressão de forma a facilitar a ruptura das estruturas lignocelulósicas. Os valores usuais de pressão são da ordem de 1 a 3,5 bar e a temperatura atinge 135°C (BARCZA, 2008).

Para a realização deste processo é necessário o uso de reservatórios metálicos que suportem altas pressões e temperaturas. Porém, estes reservatórios podem sofrer corrosão devido às altas temperaturas, à presença de materiais abrasivos e de íon cloreto proveniente dos sistemas de distribuição de água (FERREIRA et al., 2011).

Além disso, geralmente este tratamento está associado ao uso de catalisadores químicos como ácidos ou bases que promovem uma melhoria no rendimento em açúcares deste processo.

3.3.2.3 Ultrassom

O ultrassom é um método físico que em presença de suspensões aquosas de biomassa ou simplesmente sistemas aquosos, pode produzir pequenos microjatos, que são consequência do fenômeno de cavitação. Portanto, os efeitos mecânicos do ultrassom de potência sobre o material são: a diminuição do tamanho de partícula, dispersão das partículas e facilitador da dissolução do material (ALIYU; HEPHER, 2000, LUNELLI et al., 2014).

O ultrassom de potência é empregado na biomassa lignocelulósica a fim de melhorar a extração de hemicelulose, celulose e lignina e, por conseguinte, aumentar o rendimento de hidrólise enzimática (ESFAHANI; AZIN, 2012; WERLE et al., 2013).

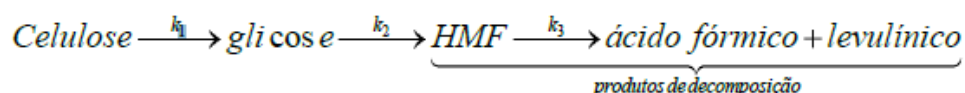
3.4 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida compreende a utilização de ácidos tais como sulfúrico (AGUILAR et al., 2002), clorídrico (CUZENS; MILLER, 1997), acético, peracético (TEIXEIRA et al., 1999), fosfórico (GÁMEZ et al., 2006). Nesse processo há a separação dos compostos lignocelulósicos, onde as frações (celulose e hemicelulose) serão submetidas à fermentação para a produção de etanol (NEUREITER et al., 2002; ROSSELL, 2006). Além

disso, podem envolver também condições como altas temperaturas e pressão de trabalho, que facilitam o processo de hidrólise.

Faz-se necessário o estudo da matéria-prima a ser utilizada já que as condições diferem em relação aos tipos de materiais usados. A hidrólise ácida de celulose pode ser representada por uma série de reações como é mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Reação de hidrólise ácida da celulose



Fonte: Pietrobon (2008)

Pietrobon (2008) diz que durante o processo de hidrólise são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses provenientes da hidrólise da fração hemicelulose e as hexoses, geradas na degradação de parte da hemicelulose e celulose.

A hidrólise ácida permite atuação seletiva inicial sobre a hemicelulose, heteropolissacarídeo ramificado de cadeia reduzida e amorfo, devido a diferenças estruturais com a celulose, homopolissacarídeo linear de cadeia muito longa e regiões cristalinas. A hemicelulose pode ser seletivamente hidrolisada em condições mais suaves (LEE et al., 1996), sob controle da concentração ácida e da temperatura, aos seus componentes monossacarídeos (RAHMAN et al., 2007), sem afetar a celulose e com reduzido efeito sob a lignina.

O tratamento ácido é eficiente em solubilizar e hidrolisar a celulose e hemicelulose da biomassa. Combinações de temperatura, pressão, concentração do ácido e tempo de reação podem resultar em altos níveis de açúcares para fermentação.

Rossell et al., (2005) relatam que os ácidos minerais agem rapidamente como catalisadores na hidrólise dos polissacarídeos em açúcares redutores. Normalmente, são empregados os ácidos sulfúrico ou clorídrico e podem prescindir do pré-tratamento.

O maior interesse na pesquisa em hidrólise ácida diluída é resultado de que esse processo é economicamente mais favorável para produção de bioetanol, visto que ele é baseado em baixo consumo de ácido o que diminui os custos com matéria-prima e equipamentos devido à menor corrosão durante o processo (CHENG et al., 2008; GURGEL, 2010).

Quando o ácido diluído é usado, o processo requer altas temperaturas e pressões para alcançar taxas aceitáveis de hidrólise à glicose em tempos razoavelmente curtos

devido à inacessibilidade dos cristais de celulose (GÁMEZ et al., 2006). Devido à natureza sequencial da reação, o rendimento de glicose é limitado.

Em contraste ao processo com ácido diluído o processo ácido concentrado pode dar rendimentos maiores de glicose em baixas temperaturas. Por outro lado, o custo do ácido é relativamente alto e esse deve ser recuperado para tornar o processo viável (PESSOA Jr et al., 1997; CHENG et al., 2008).

3.4.1 Compostos tóxicos derivados da hidrólise ácida

Durante o pré-tratamento do material lignocelulósico ou nos processos de hidrólise catalisada por ácidos, não se obtém somente os açúcares provenientes da hidrólise. Na dissolução da celulose e hemicelulose, justamente por causa das altas temperaturas e condições ácidas nas quais se desenvolvem estes tratamentos é originada uma série de compostos que pode atuar como inibidores potenciais da fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo percentual de celulose, hemicelulose e lignina), do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos (ROSSELL, 2006).

Os materiais lignocelulósicos apresentam elevado teor de hemiceluloses (30%) constituídas predominantemente de polímeros de pentoses (xilanas e xilo-arabanas). Em virtude da alta reatividade das pentoses (particularmente a xilose), em temperaturas superiores a 140°C, a seletividade e o rendimento sacarídico do processo de hidrólise das hemiceluloses podem ser comprometidos, quando se realizam pré-tratamentos hidrolíticos do bagaço de cana-de-açúcar sob temperaturas superiores a 180°C durante tempos de processo da ordem de 30-60 minutos. A adoção de condições severas de processo tende a incrementar a degradação da xilose em furfural, bem como promover a degradação da glicose em hidróximetilfurfural (HMF), compostos potencialmente inibidores da fermentação etanólica (LASER et al., 2002; CARRION; DORTA, 2009; MILLER et al., 2012).

A solubilização e fracionamento da lignina, associada a elevadas severidades de processo, são potencialmente prejudiciais às etapas subseqüentes (fermentação), em virtude da deposição de lignina sobre a superfície da polpa celulósica, bem como da geração de compostos inibidores da fermentação tais como derivados fenólicos e ácidos orgânicos (FELIPE et al., 1997; AGUILAR et al., 2002; PEREIRA et al., 2007).

Existem algumas técnicas para a remoção desses compostos tóxicos como o tratamento com hidróxidos alcalino-terrosos (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008), adsorção em carvão ativo e carvão vegetal (MUSSATO; ROBERTO, 2001), diluição do hidrolisado, coluna de troca iônica (MARTON et al., 2003, CANILHA; SILVA; SOLENZAL, 2004), evaporação à vácuo (RODRIGUES et al., 2001) entre outras.

3.5 Fermentação dos açúcares derivados da hidrólise

Empregando pré-tratamentos e hidrólise ácida na matriz lignocelulósica, é possível obter principalmente dois monômeros. A glicose a partir da celulose e a xilose a partir da hemicelulose. Estes açúcares podem dar origem a vários bioprodutos pela via fermentativa, entre eles o bioetanol. Utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, a glicose pode ser convertida em etanol desde que haja o controle do processo para evitar os inibidores da fermentação como pH, ácido lático, sulfito e contaminação microbiana (TAKAHASHI, 1998; DORTA et al., 2006).

Quanto à fermentação das pentoses, poucos micro-organismos possuem a capacidade de fermentar estas a etanol (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985).

Três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica das pentoses: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* (DU PREEZ et al., 1986; AGBOGBO et al., 2006; MUSSATO; ROBERTO; TEIXEIRA, 2011;) e *Pachysolen tannophilus* (SÁNCHEZ et al. 2004; ZHAO; ZHANG; TAN, 2008) porém o desempenho das mesmas é muito limitado. O metabolismo das pentoses exige a presença de nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado. Estas cepas apresentam baixa tolerância ao etanol e aos ácidos alifáticos (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985; RUDOLF et al., 2008).

Para realizar a fermentação alcoólica de um licor contendo pentoses e hexoses, as possibilidades em estudo são: fermentação simultânea ou sequencial de pentoses e hexoses, ou seja, processo de conversão direta pelo micro-organismo (CDM). Na fermentação simultânea, dois micro-organismos que fermentem respectivamente a glicose e a xilose são cultivados em co-cultura. A maioria dos trabalhos realizados neste campo utilizou duas leveduras: *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (pentoses) (TANIGUCHI et al., 1997; HICHERT, 2010). As dificuldades encontradas foram: o metabolismo da xilose procede mais lentamente que o da glicose, provocando a inibição alcoólica sobre o micro-organismo que metaboliza as pentoses; repressão catabólica da glicose sobre a utilização da xilose; competição entre *S.*

cerevisiae e a levedura responsável pela fermentação da xilose pelo oxigênio presente no meio; possível incompatibilidade entre as duas cepas (ROSSELL, 2006; RUDOLF et al., 2008).

Uma alternativa é a de operar a fermentação em um esquema seqüencial (monocultura), fermentando primeiro a glicose e depois a xilose (ou vice-versa). Os melhores resultados obtidos até agora foram usando uma linhagem mutante de *Escherichia coli* incapaz de metabolizar glicose, seguida de uma segunda etapa de fermentação da glicose com *S. cerevisiae* (RUDOLF et al., 2008). No entanto, para este processo pode-se utilizar a *S. cerevisiae* que fermenta a glicose, em conjunto com a fermentação de xilose que pode ser convertida a etanol pelas leveduras *P. stipitis* ou *P. tannophilus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parte 1 – Obtenção de açúcares fermentescíveis da casca de uva Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida aplicando o planejamento fatorial 2²

4.1.1 Coleta do material

As cascas de uvas Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc, utilizadas nas análises, foram obtidas da vinícola Góes de São Roque – SP, safra de 2013.

O bagaço de cana-de-açúcar, sendo um material vegetal mais estudado pela literatura na obtenção de açúcares fermentescíveis do que a casca de uva, foi utilizado como controle. Este material foi obtido da Usina Guaraní de Olímpia – SP, safra de 2013.

4.1.2 Preparo do material

As cascas das duas variedades de uvas e o bagaço de cana-de-açúcar sofreram processo de secagem em estufa (Modelo 315-SE, FANEM) a 100 °C por 24 horas. Posteriormente, as cascas de uvas foram trituradas em liquidificador e as amostras foram reservadas em freezer até o momento de análise.

4.1.3 Pré-hidrólise alcalina

Realizou-se a pré-hidrólise alcalina das cascas de uvas Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc com o objetivo de verificar se esta etapa melhorava o rendimento da etapa seguinte, a hidrólise ácida, analisando se haveria aumento no rendimento de açúcares redutores fermentáveis – glicose e xilose.

Adotou-se o método citado por Aguiar (2010), com algumas adaptações, utilizando-se de solução alcalina hidróxido de sódio (NaOH) na proporção 1:10 (p/v) em autoclave à temperatura de 121 °C.

Os testes de pré-hidrólise variaram nas condições de concentração da solução de hidróxido de sódio e o tempo de permanência na autoclave sendo realizados baseados na matriz de planejamento fatorial 2², que é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial 2² para os testes de pré-hidrólise alcalina

Experimento	Concentração de NaOH	Tempo
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Dados do autor

Na Tabela 4, encontram-se os valores reais das condições em que foram aplicados os testes de pré-hidrólise alcalina e os níveis codificados.

Tabela 4 - Valores reais e níveis dos fatores aplicados na pré-hidrólise alcalina

	Nível -1	Ponto Central 0	Nível +1
Concentração de NaOH (% v/v)	2	4,5	7
Tempo (minutos)	15	30	45

Fonte : Dados do autor

O bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como controle do teste, sendo tratado nas mesmas condições que as cascas de uvas e simultaneamente a cada uma delas.

4.1.4 Hidrólise ácida

Posteriormente à pré-hidrólise alcalina, as cascas das duas variedades de uvas foram submetidas à hidrólise ácida baseada na metodologia de Aguilar et. al. (2002) com algumas adaptações. Utilizou-se solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na proporção 1:10 (p/v) em autoclave à temperatura de 121 °C.

Os testes de hidrólise variaram nas condições de concentração da solução de ácido sulfúrico e o tempo de tratamento em autoclave e foram realizados baseados na matriz de planejamento fatorial 2², que é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Matriz de planejamento fatorial 2^2 para os testes de hidrólise ácida

Experimento	Concentração de H_2SO_4	Tempo
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte : Dados do autor

Na Tabela 6, encontram-se os valores reais das condições em que foram aplicados os testes de hidrólise ácida e os níveis codificados.

Tabela 6 -Valores reais e níveis dos fatores aplicados na hidrólise ácida

	Nível -1	Ponto Central 0	Nível +1
Concentração de H_2SO_4 (% v/v)	2	4	6
Tempo (minutos)	15	30	45

Fonte : Dados do autor

Foi realizada também a hidrólise ácida das cascas das duas variedades de uvas sem que as mesmas fossem pré-hidrolisadas com o objetivo de comparar os rendimentos obtidos nos dois tratamentos (Tratamento 1: hidrólise ácida com as amostras previamente pré-hidrolisadas; Tratamento 2: hidrólise ácida com as amostras não pré-hidrolisadas) e assim, confirmar se a pré-hidrólise aumenta a eficiência da hidrólise ácida.

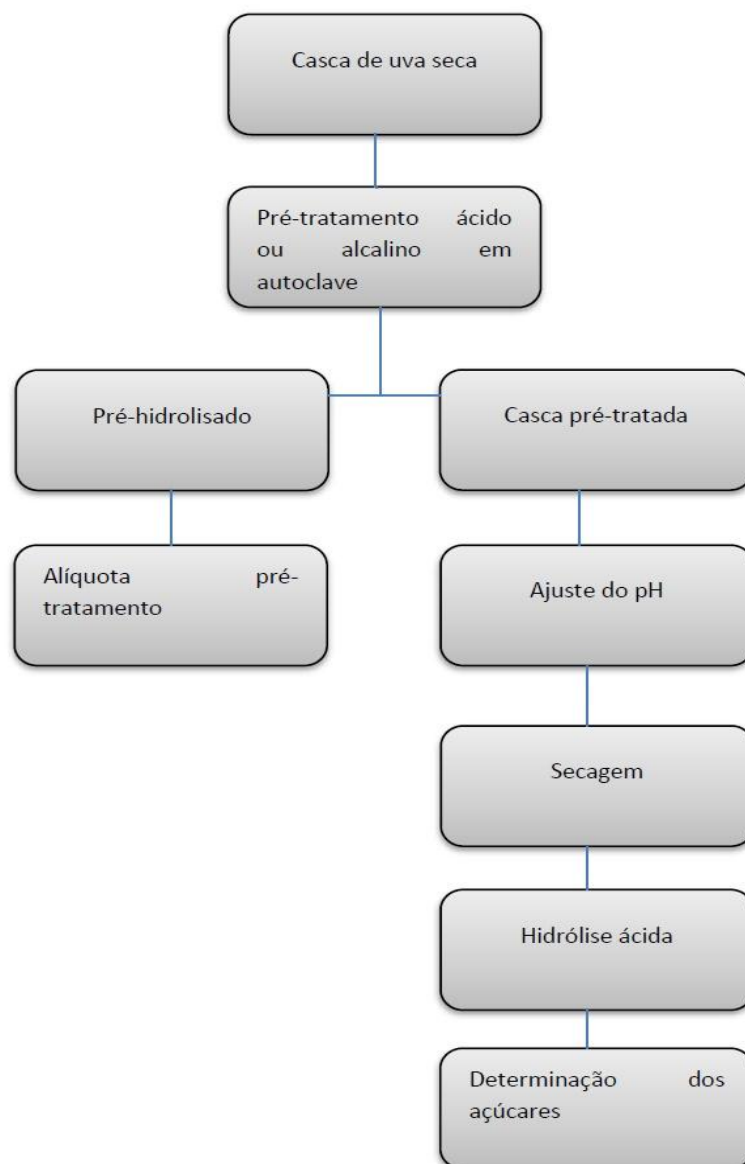
O Tratamento 2 foi realizado da mesma forma que o Tratamento 1 e a matriz do planejamento fatorial pode ser observado na Tabela 4. Além disso, o Tratamento 2 foi realizado simultaneamente ao Tratamento 1 para cada uva, para que ocorressem nas mesmas condições de análise.

O bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como controle dos testes, sendo tratado nas mesmas condições que as cascas de uvas e simultaneamente a cada uma delas.

4.2 Parte 2 – Pré-tratamento ácido ou alcalino em autoclave e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon

Os experimentos foram conduzidos seguindo o fluxograma da Figura 7

Figura 7 - Fluxograma de execução do experimento Parte 2



Fonte: Dados do autor

4.2.1 Matéria-prima e reagentes

A casca da uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinífera* L.) proveniente da safra de 2014 foi gentilmente cedida pela Vinícola Góes de São Roque/SP. Os reagentes utilizados foram: ácido sulfúrico (H_2SO_4), fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH).

4.2.2 Pré-tratamento ácido ou alcalino

Realizou-se uma pré-hidrólise ácida ou alcalina na proporção 1:10 (10 g de casca de uva para 100 mL de solução) com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio em autoclave vertical (Modelo AV75 – Phoenix) a 121 °C nos respectivos tempos de reação e concentração do reagente como mostra a Tabela 7 (metodologia adaptada de GÀMEZ et al., 2006 e XU et al., 2010).

Tabela 7 - Concentração do reagente e tempo de reação nos ensaios utilizando pré-tratamento ácido ou alcalino para hidrólise ácida

Experimentos	Concentração do reagente(%)			Tempo de reação (min)		
	2	4,5	7	15	30	45
1	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-	+
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	+	-
9	-	-	+	-	-	+

Fonte : Dados do autor

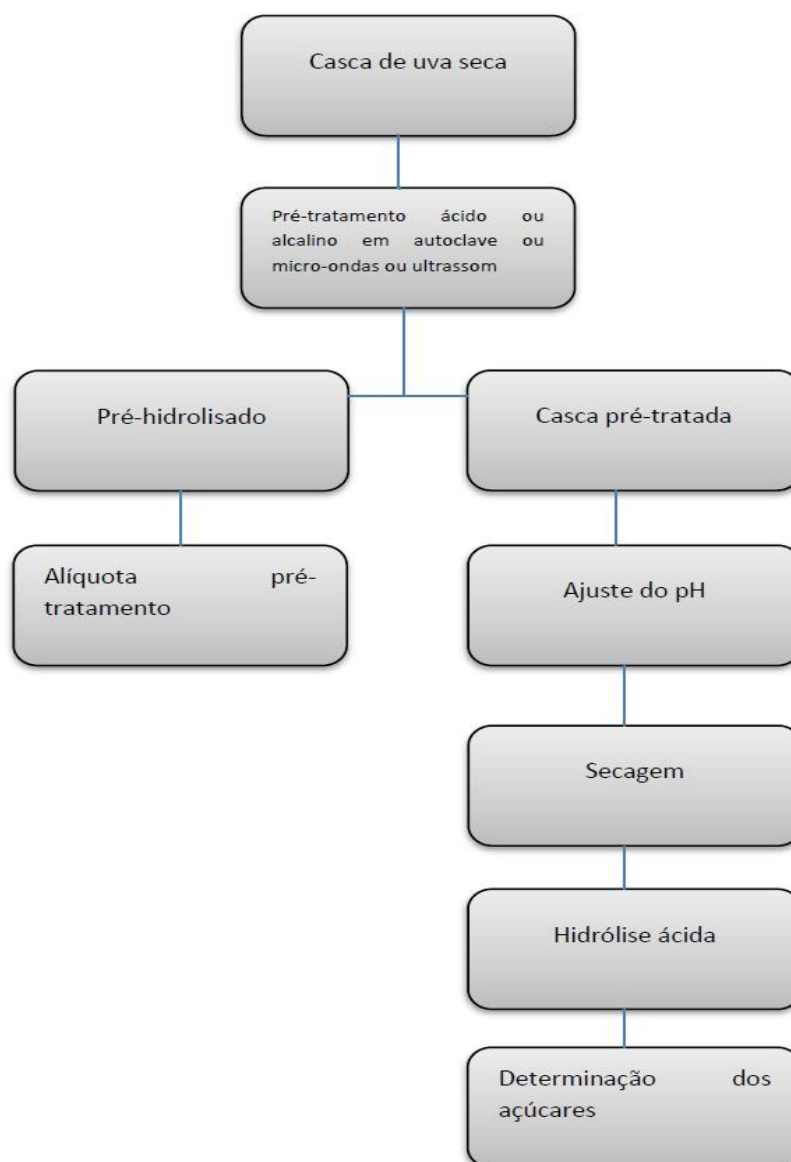
4.1.3 Hidrólise ácida

Foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_2SO_4 a 2% e levados em autoclave vertical (Modelo AV75 – Phoenix) a 121 °C por 60 minutos (metodologia adaptada de AGUILAR et al.,2002).

4.3 Parte 3 Avaliação dos pré-tratamentos físicos em autoclave, micro-ondas ou ultrassom com pré-tratamentos ácidos ou alcalinos e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon

O experimento foi conduzido seguindo as etapas do fluxograma da Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma de execução do experimento Parte 3



Fonte: Dados do autor

4.3.1 Coleta e preparo do material

As cascas de uva provenientes da vinícola Góes, safra de 2014, foram secas em estufa (Modelo 315-SE, FANEM) 60 °C por 24 horas e depois trituradas. Foram armazenadas em refrigerador até o momento da utilização.

4.3.2 Pré-tratamentos

Os pré-tratamentos físicos em autoclave, micro-ondas e ultrassom com ácidos ou álcalis foram realizados seguindo a Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração dos reagentes e tempos de tratamento do experimento 3

Experimentos	Concentração de reagente(%)			Tempo de reação (min)		
	2	4,5	7	5	12,5	20
1	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-	+
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	+	-
9	-	-	+	-	-	+

*Experimentos em triplicata

Fonte : Dados do autor

4.3.2.1 Autoclave

Foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_3PO_4 ou NaOH e levados em autoclave vertical (Modelo AV75 – Phoenix) a 121 °C (Tabela 8).

4.3.2.2 Micro-ondas

Foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_3PO_4 ou NaOH e levados em micro-ondas doméstico (Figura 9) (Modelo Family-Panagrill 31 L, PANASONIC) (Tabela 8).

Figura 9 - Micro-ondas doméstico utilizado no experimento



Fonte: Dados do autor

4.3.2.3 Ultrassom

Foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_3PO_4 ou NaOH e levados em sonda ultrassônica operante a 22 kHz e potência de 50 W (Figura 10) (Modelo 50 SonicDismembrator, FISHER SCIENTIFIC) seguindo os experimentos descritos na Tabela 8.

Figura 10 - Equipamento de ultrassom utilizado no experimento



Fonte: Dados do autor

4.3.3 Hidrólise ácida

Foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_2SO_4 a 2% e levados em autoclave vertical (Modelo AV75 – Phoenix) a 121 °C por 60 minutos (metodologia adaptada de AGUILAR et al.,2002).

4.4 Parte 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para pré-tratamento alcalino em micro-ondas.

4.4.1 Coleta e preparo do material

As cascas de uva provenientes da vinícola Góes, safra de 2014, foram secas em estufa (Modelo 315-SE, FANEM) 60 °C por 24 horas e depois trituradas. Foram armazenadas em refrigerador até o momento da utilização.

4.4.2 Delineamento experimental

A casca de uva foi submetida a diferentes tratamentos para avaliar os efeitos da concentração de NaOH (X_1) e tempo de reação em micro-ondas (X_2) na liberação de açúcares, através de um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , contendo 3 pontos centrais e 4 axiais. As Tabelas 9 e 10 mostram o delineamento adotado.

Tabela 9 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes (Parte 4)

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de NaOH (%)	0,5%	0,72%	1,25%	1,78%	2%
Tempo de reação (min)	5	6,5	10	13,5	15

Fonte: Dados do autor

O valor de α foi calculado em função do número de variáveis independentes ($n=2$) através da Equação 1:

$$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,4 \quad (1)$$

As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável independente foram estabelecidas de acordo com os dados de estudos anteriores e literatura (HU; WEN, 2008; AGUIAR, 2010).

Tabela 10 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional (Parte 4)

Ensaios	X1	Concentração NaOH	X2	Tempo
1	-1	0,72%	-1	6,5
2	+1	1,78%	-1	6,5
3	-1	0,72%	+1	13,5
4	+1	1,78%	+1	13,5
5	0	1,25%	-1,41	5
6	0	1,25%	+1,41	15
7	-1,41	0,5%	0	10
8	+1,41	2%	0	10
9	0	1,25%	0	10
10	0	1,25%	0	10
11	0	1,25%	0	10

Fonte: Dados do autor

4.4.3 Hidrólise ácida

Após o pré-tratamento foram colocados, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 10 g do pré-hidrolisado com 100 mL de solução de H_2SO_4 a 2% e levados em autoclave vertical (Modelo AV75 – Phoenix) a 121°C por 30 minutos (metodologia adaptada de AGUILAR et al.,2002).

4.5 Parte 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para hidrólise ácida em autoclave

4.5.1 Coleta e preparo do material

A casca de uva foi submetida ao pré-tratamento com NaOH em micro-ondas que apresentou os melhores resultados na etapa anterior, sendo esta condição com 0,72% de NaOH por 13,5 minutos em micro-ondas. Após esta etapa o material foi filtrado e o pH ajustado para 7,0 com H_2SO_4 0,5% e novamente seco em estufa 60 °C. Posteriormente a secagem a casca foi submetida a hidrólise de acordo com o planejamento experimental da Tabela 12.

4.5.2 Delineamento experimental

A casca de uva foi submetida a diferentes tratamentos para avaliar os efeitos da concentração de H_2SO_4 (X_1) e tempo de reação em autoclave (X_2) na liberação de açúcares, através de um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , contendo 3 pontos centrais e 4 axiais. As Tabelas 11 e 12 mostram o delineamento adotado.

Tabela 11 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes (Parte 5)

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de H_2SO_4 (%)	2%	2,6%	4%	5,4%	6%
Tempo de reação (min)	5	6,5	10	13,5	15

Fonte: Dados do autor

O valor de α foi calculado em função do número de variáveis independentes ($n=2$) através da Equação 1:

$$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,41 \quad (1)$$

As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável independente foram estabelecidas de acordo com os dados de estudos anteriores e literatura (AGUILAR et al., 2002)

Tabela 12 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional (Parte 5)

Ensaios	X_1	Concentração H_2SO_4	X_2	Tempo
1	-1	2,6%	-1	6,5
2	+1	5,4%	-1	6,5
3	-1	2,6%	+1	13,5
4	+1	5,4%	+1	13,5
5	0	4%	-1,41	5
6	0	4%	+1,41	15
7	-1,41	2%	0	10
8	+1,41	6%	0	10
9	0	4%	0	10
10	0	4%	0	10
11	0	4%	0	10

Fonte: Dados do autor

4.6 Parte 6 – Fermentação de mostos sintéticos contendo glicose e xilose

4.6.1 Manutenção da Cultura Estoque

Neste estudo foram utilizadas três leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* (comercial Fleishmann), e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Pichia stipitis* CCT 2617, foram gentilmente cedidas pela Fundação André Tosello, Coleção Tropical de Culturas de Campinas/SP. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus* CCT 2380 e *Pichia stipitis* CCT 2617 foram cultivadas em tubo de ensaio com tampão com o meio YEPD (extrato de levedura, peptona, dextrose, ágar) para *S.cerevisiae* e YEPX (extrato de levedura, peptona, xilose e ágar) para *P.tannophilus* e *P.stipitis*, onde o crescimento ocorreu em temperatura de 30 °C por 24 horas em incubadora BOD, e posteriormente os tubos foram mantidos em refrigerador a 5°C.

4.6.2 Padronização do inóculo

Um volume de 8 mL da cultura estoque (que corresponde a um inóculo com uma absorvância de 0,8, medida a 600 nm) foi transferido em frascos de erlenmeyer, contendo 100 mL do meio de cultivo, composição descrita na Tabela 13. As culturas foram conduzidas em incubadoras, sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 30 °C por aproximadamente 24 horas, para produção do inóculo. Após este período, 10 mL da cultura foram centrifugados a 2 g por 20 minutos. O sedimento de célula foi lavado duas vezes em água peptonada 0,1%, antes de ser adicionado aos meios de cultivo (MURARI et al., 2013 adaptado de SILVEIRA, 2006).

Tabela 13 - Composição do meio de cultivo utilizado para padronização do inóculo das leveduras e meio fermentativo.

Compostos	Concentração % (p:v)
Extrato de levedura	0,5%
Peptona	0,5%
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03%
MgSO ₄	0,035%
Na ₂ HPO ₄	0,05%
K ₂ HPO ₄	0,05%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1%
D-xilose ou D-glicose*	2%

*Para *S.cerevisiae* utilizou-se glicose e para *P. tannophilus* e *P. stipitis* utilizou-se xilose.
Fonte: Dados do autor

4.6.3 Fermentação

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo (Tabela 13) com pH ajustado para 5,0 com HCl 0,1M. Estes frascos foram vedados com tampão de algodão. Uma vez padronizado o inóculo inicial (10% no meio de cultivo), foram incubados em shaker (Modelo Luca-222, LUCADEMA), sob agitação de 100 rpm, à 30 °C por 48 horas.

Alíquotas foram retiradas de 6 em 6 horas para determinação do crescimento celular e consumo de açúcar.

4.7 Parte 7 – Pré-tratamento e hidrólise da casca de uva e fermentação do hidrolisado

4.7.1 Pré-tratamento e hidrólise da casca de uva

A casca de uva foi submetida ao pré-tratamento em micro-ondas com NaOH 0,72% na proporção de 1:10, por 13,5 minutos. Após este procedimento o material foi filtrado e o pH ajustado para 5,0. O líquido obtido após a filtração foi armazenado sob refrigeração (5°C) e a parte sólida foi levada para secar em estufa 60 °C por 24h.

O material já seco foi submetido a hidrólise ácida com H₂SO₄ 2,6% na proporção 1:10, em autoclave por 13,5 minutos. Após o período de tratamento o material foi filtrado. A casca restante foi descartada e o líquido foi direcionado para a etapa de remoção dos compostos tóxicos.

4.7.2 Remoção dos compostos tóxicos e concentração do mosto

O hidrolisado sofreu ajuste de pH com hidróxido de cálcio (3 mg/mL) até o atingir 5,0. Passou-se o hidrolisado numa coluna com carvão ativo (300 mL de hidrolisado para 2,7 g de carvão ativo Synth em pó, com partículas a 0,043 mm; distribuído num volume de 84,5 cm³) através da pressão gerada por bomba a vácuo.

Após esta etapa, o hidrolisado foi misturado ao pré-hidrolisado e levado a banho-maria (Modelo Luca 150/10, LUCADEMA) a 99 °C para concentração dos açúcares.

4.7.3 Fermentação do hidrolisado

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de hidrolisado com pH ajustado para 5,0 com HCl 0,1M. Estes frascos foram vedados com tampão de algodão. Uma vez padronizado o inóculo inicial (10% no meio de cultivo) foram incubados em shaker (Modelo Luca -222, LUCADEMA), sob agitação de 100 rpm, a 30 °C por 24 horas.

Alíquotas foram retiradas de 3 em 3 horas para determinação do crescimento celular e consumo de açúcar.

4.8 Métodos analíticos

4.8.1 Concentração de açúcar redutor

O consumo de xilose e glicose foi medido por ADNS (ácido dinitrossalicílico) (MILLER, 1959), utilizando-se 0,5 mL da amostra diluída e adicionando volume igual de solução de DNS nos tubos de ensaio, fervidos a seguir durante 5 minutos. A amostra foi resfriada e em seguida adicionou-se 4 mL de água destilada. Simultaneamente, foi feito um diagrama de calibração (Figura 5 do Apêndice A) mista de xilose e glicose (P.A. Labsynth). A leitura em espectrofotômetro (Modelo SP-22, BIOESPECTRO) foi feita a 540 nm. Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

4.8.2 Concentração de Xilose

A determinação da concentração de xilose foi feita através de uma técnica clínica que mede a concentração desta pentose no plasma sanguíneo ou urina, adaptado para as amostras de pré-hidrolisado da casca de uva. Para ser realizada a análise, o floroglucinol deve ser dissolvido numa solução de ácido acético e ácido clorídrico (9:1, v/v) até a concentração de 36 mMol/L. As pentoses formam, em meio ácido, um complexo colorido com o floroglucinol que se pode determinar através da leitura colorimétrica (EBERTS et al., 1979; JOHNSON et al., 1984). Para que a reação da solução ácida e xilose ocorressem foram pipetados em tubos de ensaio os reagentes de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14 - Protocolo experimental para análise da concentração de xilose das amostras

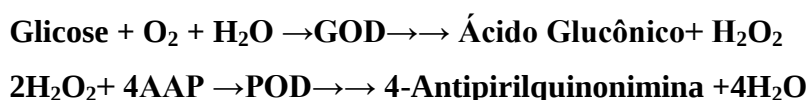
	Tubo de referência	Tubo do padrão	Tubos das amostras
Solução ácida (ác. acético e clorídrico)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Água destilada	0,1 mL	--	--
Sol. padrão xilose (0,01%)	--	0,1 mL	--
Amostras	--	--	0,1 mL

Fonte: Adaptado de EBERTS et al., 1979; JOHNSON et al., 1984

Para melhor monitoramento foi feito um diagrama de calibração (Figura 6 do Apêndice A). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Modelo SP-22, BIOESPECTRO) à 554 nm. Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

4.8.3 Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo sistema colorimétrico para determinação de glicose (Doles TM). A metodologia consiste em adicionar glicose em uma solução tampão de fosfatos pH 7,4, contendo Glicose Oxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipirina (4-AAP) e p-hidrobenczoato (reagente de cor), quando processam-se as seguintes reações:



O método é baseado na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD), resultando em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, onde este é somado a 4-aminoantipirina e 4 moléculas de água. O produto formado é 4-antipirilquinonimina, pela oxidação de 4-AAP, é de coloração rósea intensa e sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. Os reagentes são misturados e incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, a cor é medida em espectrofotômetro (Modelo SP-22, BIOESPECTRO) com absorção de 510 nm (Tabela 15). Foi feito um diagrama de calibração (Figura 7 do Apêndice A). Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

Tabela 15. Protocolo experimental para determinação das concentrações de glicose nas amostras

	Tubo de referência	Tubo das amostras	Tubo do padrão
Reagente de cor (kit Glucox)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Solução padrão de glicose (0,01%)	--	--	20µL
Amostras	--	20µL	--

Fonte: Adaptado de TRINDER, 1969; BARHAM; TRINDER, 1972; WESTGARD et al., 1981

4.8.4 Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica a 600 nm.

As leveduras estudadas foram ativadas para a produção do inóculo conforme descrito no item 4.6.2. Posterior à padronização do inóculo inicial em uma Densidade Ótica (D.O) 600 nm de 0,8, em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL do meio de cultivo base com concentração inicial de açúcares de 20 g L⁻¹, as culturas foram inoculadas separadamente, e conduzidas para incubação sob agitação de 150 rpm por 24 horas, a uma temperatura de 30 °C. Após 24 horas, as células ativadas foram separadas por centrifugação a 2 g, por 20 minutos e utilizadas para o preparo de suspensão em 5 mL de água destilada. Foram retiradas alíquotas da suspensão para determinação de massa seca a 105 °C por 24 horas, conforme metodologia descrita pela AOAC (*Association of Analytical Chemistry, Official methods of Analysis*). Uma amostra de 1 mL da suspensão foi utilizada para a realização das seguintes diluições 2x10⁻², 3x10⁻², 4x10⁻², 5x10⁻² e 6x10⁻². A regressão linear entre absorbância e massa seca celular (g L⁻¹) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de D.O a 600 nm (Figuras 1, 2, 3 e 4 Apêndice A) (SILVEIRA, 2006).

4.8.5 Medida de Crescimento

O crescimento dos micro-organismos foi estimado pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. O valor da D.O foi convertida em massa celular, de acordo com a relação obtida no item 4.8.4

Equação 2. Produtividade Celular

$$P_x = Xf - X0 / tf \quad (2)$$

Onde: Xf = concentração biomassa final ($g L^{-1}$); $X0$ = concentração biomassa inicial ($g L^{-1}$); tf = tempo total de fermentação (horas), P_x = produtividade em biomassa ($g L.h^{-1}$).

Equação 3. Conversão substrato a biomassa ($g g^{-1}$)

$$Y_{x/s} = Xf - X0 / St - Sf \quad (3)$$

Onde: Xf = concentração produto final ($g L^{-1}$); $X0$ = concentração produto inicial ($g L^{-1}$); St = concentração substrato total ($g L^{-1}$); Sf = concentração substrato final ($g L^{-1}$); $Y_{x/s}$ = fator de conversão substrato a produto ($g g^{-1}$).

4.8.6 Determinação dos parâmetros de hidrólise

A conversão do substrato (casca de uva) em açúcares foi medida pela equação 4.

Equação 4. Conversão substrato a açúcares ($g g^{-1}$)

$$YS = CV/M \quad (4)$$

Onde: C = concentração final do produto ($g L^{-1}$); V = volume final da solução líquida (L); M = massa seca da casca de uva utilizada no experimento (g); YS = fator de conversão de substrato a açúcares ($g g^{-1}$).

4.8.7 Etanol

O etanol obtido da fermentação do meio sintético foi determinado por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando Cromatógrafo - HP-5890 Série II - detector FID (Flame Ionization Detector), coluna – HP-FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,3 μm); temperatura do forno de 70 °C (mantendo esta temperatura por toda corrida - isotérmica); tempo da corrida de 3,2 min; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura do detector de 250 °C; injeção de 40 μl de vapor da amostra. As amostras foram deixadas em “dryblock” a uma temperatura de 40 °C (até atingir o equilíbrio).

4.8.7.1 Cálculos relacionados à produção etanólica**Equação 5. Fator de conversão substrato a etanol ($g g^{-1}$)**

$$Y_{E/S} = Ef - E0 / St - Sf \quad (5)$$

Onde: Ef= concentração produto final (gL^{-1}); E0= concentração produto inicial (gL^{-1}); St= concentração substrato total (gL^{-1}); Sf = concentração substrato final (gL^{-1}); $Y_{E/S}$ = fator de conversão substrato a produto (g g^{-1}).

Equação 6. Produtividade em etanol (g L.h^{-1})

$$P_e = Ef - E0 / t_f \quad (6)$$

Onde: Ef = concentração produto final (gL^{-1}); E0 = concentração produto inicial (gL^{-1}); t_f = tempo total de fermentação (horas); P_e = produtividade em etanol (gL.h^{-1}).

Equação 7. Rendimento Etanólico (%)

$$\eta = (Ef - E0) * 100 / (St - Sf) * 0,5111 \quad (7)$$

Onde: Ef= concentração produto final (gL^{-1}); E0= concentração produto inicial (gL^{-1}); St= concentração substrato total (gL^{-1}); Sf = concentração substrato final (gL^{-1}) 0,5111 = estequiometria para conversão da glicose/xilose em etanol.

4.9 Análise estatística

4.9.1 Forma de análise dos resultados – Parte 1, 2, 3

Os dados da concentração de açúcares foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey através do programa GRAPHPADINSTAT (Rutgers University Camden, New Jersey). Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$.

4.9.2 Forma de análise dos resultados- Planejamento DCCR – Parte 1, 4 e 5

Como respostas a estes planejamentos, as variáveis dependentes foram as determinações de açúcares redutores (AR) por DNS descrito por Miller (1959), além de

glicose (TRINDER, 1969; BARHAN; TRINDER, 1972; WESTGARD et al., 1981) e xilose (EBERTS et al., 1979; JOHSON et al., 1984).

Os resultados foram analisados por meio do software Statistica® 10.0., sendo utilizada uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição ou não do modelo matemático.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parte 1 – Açúcares fermentescíveis obtidos da casca de uva Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e bagaço de cana após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida

As concentrações de glicose e xilose dos testes de pré-hidrólise alcalina das uvas Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon encontram-se resumidos nas Tabelas 16 e 17, respectivamente, juntamente com as concentrações de açúcar da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar que foi feita simultaneamente com cada uva, nas mesmas condições, como forma de controle.

Tabela 16 - Concentração de glicose e xilose da pré-hidrólise alcalina da uva Cabernet Franc e do bagaço de cana-de-açúcar

Concentração de NaOH (%)	Tempo de Pré-hidrólise (min)	Concentração Média de Glicose (g L ⁻¹)		Concentração Média de Xilose (g L ⁻¹)	
		Cabernet Franc	Cana-de-açúcar	Cabernet Franc	Cana-de-açúcar
2	15	0,27 ± 0,055 A ¹ a ¹	0,48 ± 0,056 Ab	0,39 ± 0,055 Aa	0,50 ± 0,056 Ab
	45	0,29 ± 0,048 Aa	0,56 ± 0,048 Ab	0,42 ± 0,048 ABa	0,69 ± 0,048 Bb
4,5	30	0,54 ± 0,051 Ca	0,67 ± 0,054 Bb	0,77 ± 0,051 Da	0,80 ± 0,054 Ca
	15	0,34 ± 0,045 Ba	0,57 ± 0,054 ABb	0,49 ± 0,045 BCa	0,67 ± 0,054 Bb
7	45	0,40 ± 0,044 Ba	0,60 ± 0,055 ABb	0,57 ± 0,044 Ca	0,68 ± 0,055 Bb

(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

Fonte: Dados do autor

Para a uva Cabernet Franc, o pré-tratamento que resultou na maior concentração de açúcares fermentescíveis foi aquele aplicado nas condições de hidróxido de sódio a 4,5% por 30 minutos em autoclave (4,5/30) assim como para o bagaço de cana. Os

valores encontrados xilose não diferiram estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$), porém a concentração de glicose encontrada no bagaço difere estatisticamente da encontrada na uva Cabernet Franc (Tukey, $P < 0,05$).

Tabela 17 - Concentração de glicose e xilose da pré-hidrólise alcalina da uva Cabernet Sauvignon e do bagaço de cana-de-açúcar

Concentração de NaOH (%)	Tempo de Pré-hidrólise (min)	Concentração Média de Glicose (g L ⁻¹)		Concentração Média de Xilose (g L ⁻¹)	
		Cabernet Sauvignon	Cana-de-açúcar	Cabernet Sauvignon	Cana-de-açúcar
2	15	0,52 ± 0,056 Ca	0,55 ± 0,044 Aa	0,73 ± 0,056 Ba	0,63 ± 0,044 Aa
	45	0,37 ± 0,058 Aa	0,62 ± 0,047 ABb	0,53 ± 0,058 Aa	0,77 ± 0,047 Bb
4,5	30	0,61 ± 0,056 Ca	0,79 ± 0,039 Cb	0,86 ± 0,056 Ca	0,89 ± 0,039 Ca
	15	0,50 ± 0,054 BCa	0,66 ± 0,050 Bb	0,71 ± 0,054 Ba	0,80 ± 0,050 BCa
7	45	0,45 ± 0,053 ABa	0,78 ± 0,047 Cb	0,65 ± 0,053 Ba	0,81 ± 0,047 BCb

(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, $P > 0,05$).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Tukey, $P > 0,05$).

Fonte: Dados do autor

De acordo com a Tabela 17, o melhor pré-tratamento para obtenção de açúcares (glicose e xilose) da casca de uva Cabernet Sauvignon também foi o realizado com 4,5% de hidróxido de sódio por 30 minutos, assim como para o bagaço de cana. Não houve diferença significativa (Tukey, $P > 0,05$) para obtenção de xilose ao comparar as duas matérias-primas (casca de uva e bagaço de cana).

Comparando os dados obtidos por Sousa (2014) que realizou pré-tratamento alcalino (1% NaOH) do bagaço de cana e obteve 0,66 e 0,22 g de glicose e xilose L⁻¹, respectivamente, após a hidrólise com ácido diluído, os resultados até então obtidos neste experimento foram interessantes já que esta aferição foi feita após o pré-tratamento e antes da hidrólise.

Na sequência, foram feitas as hidrólises ácidas baseadas na condição de pré-tratamento que resultou nas melhores concentrações em açúcares. As Tabelas 18 e 19 apresentam a estimativa dos efeitos e a análise de variância (ANOVA) da variável resposta glicose após a hidrólise ácida da uva Cabernet Franc pré-hidrolisada na condição de 4,5/30 (hidróxido de sódio a 4,5% por 30 minutos de autoclave).

Tabela 18 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	0,914091	0,036450	25,07819
Concentração H ₂ SO ₄ % (Linear)	-0,105000	0,094834	-1,10720
Tempo em minutos (Linear)	-0,042727	0,092653	-0,46115
Concentração H ₂ SO ₄ x Tempo	-0,125000	0,094834	-1,31810

Fonte: Dados do autor

Para a uva Cabernet Franc a análise dos efeitos mostra que os fatores exercem efeito negativo sobre a resposta glicose, ou seja, aumentar a concentração de reagente e tempo diminui a concentração de glicose.

A análise de variância (Tabela 19) mostra que os fatores não são significativos para a resposta apesar da influência que exercem. Além disso, o R² (0,51424) sendo baixo explica apenas 51% da variabilidade das respostas pelo modelo (Equação 8).

Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,011025	1	0,011025	1,225894	0,349005
Y	0,001913	1	0,001913	0,212661	0,676068
X.Y	0,015625	1	0,015625	1,737379	0,279079
Erro	0,026980	3	0,008993		
Total	0,055543	6			

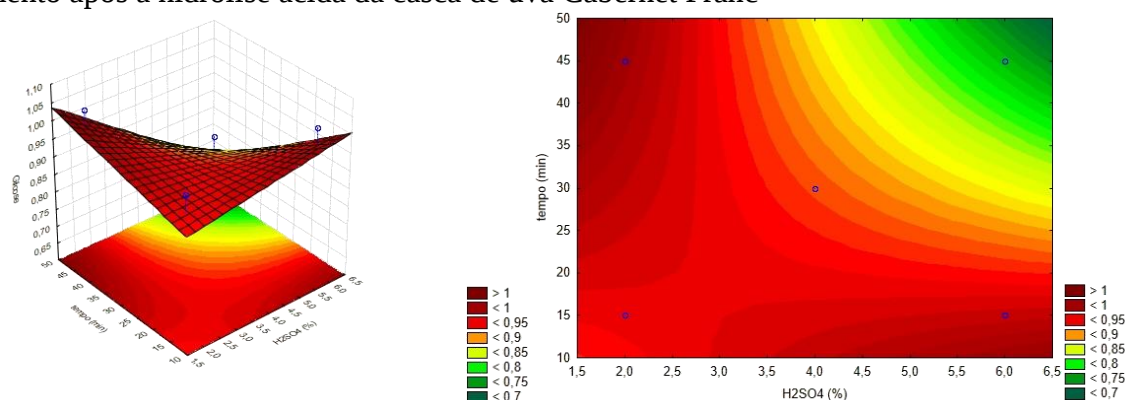
R²0,51424; R²ajustado 0,02849

Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 8. } Z = 0,842 + 0,024X + 0,004Y - 0,001XY \quad (8)$$

Pela superfície de resposta e pelo gráfico de contorno apresentados no Gráfico 1 é possível observar que o aumento da concentração do ácido por período curto de tempo (10 minutos) pode favorecer o aumento da concentração de glicose, assim como, a menor concentração do reagente por um período maior de reação.

Gráfico 1 – Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Franc



Fonte: Dados do autor

Para a variável xilose, assim como a glicose, os fatores exerceram efeito negativo sobre a concentração da resposta (Tabela 20). Da mesma forma, a análise de variância (Tabela 21) mostra que não há influência significativa dos fatores sobre a resposta e que 53% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 9).

Tabela 20 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	1,292727	0,047120	27,43469
Concentração H_2SO_4 % (Linear)	-0,145000	0,122596	-1,18275
Tempo em minutos (Linear)	-0,061818	0,119777	-0,51611
Concentração H_2SO_4 x Tempo	-0,165000	0,122596	-1,34588

Fonte: Dados do autor

Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Franc

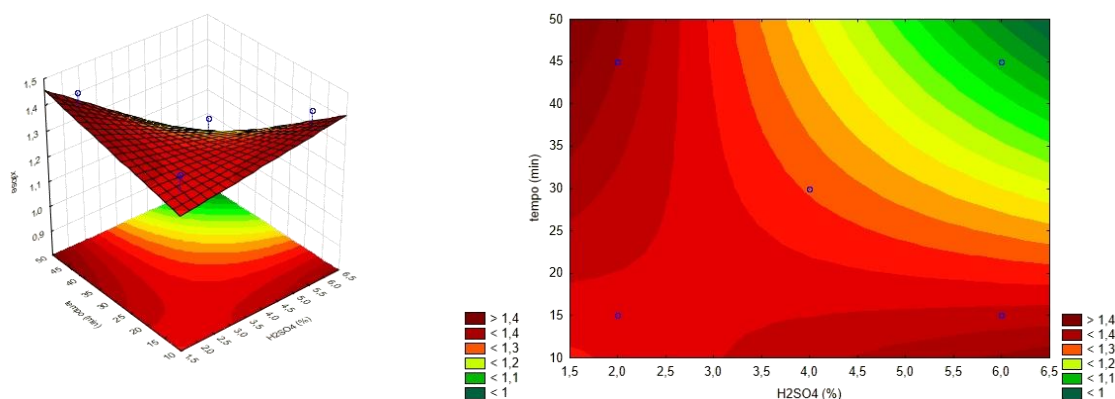
	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,021025	1	0,021025	1,398888	0,322107
Y	0,004003	1	0,004003	0,266368	0,641408
X.Y	0,027225	1	0,027225	1,811402	0,271013
Erro	0,045089	3	0,015030		
Total	0,097343	6			

R^2 0,5368; R^2 ajustado 0,0736

Fonte: Dados do autor

Equação 9. $Z = 1,214 + 0,003X + 0,013Y - 0,001XY$ (9)

Gráfico 2 – Concentração da xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Franc



Fonte: Dados do autor

O Gráfico 2 mostra que, da mesma forma que ocorre para a glicose (Gráfico 1), onde o aumento da concentração e do tempo de reação diminuem a concentração da resposta, ocorre também para xilose.

A literatura aponta que o aumento da concentração de reagentes e do tempo de reação pode levar a menor liberação de açúcares ou possivelmente destruição dos mesmos, já que longos períodos de residência em ácidos fortes com concentração mais elevada podem levar a formação de compostos de degradação dos açúcares como furfural e hidroximetilfurfural (CANILHA; SILVA; SOLENZAL, 2004).

As Tabelas 22 e 23 apresentam a estimativa dos efeitos e a análise de variância (ANOVA) da variável resposta glicose após a hidrólise ácida da uva Cabernet Sauvignon pré-hidrolisada na condição de 4,5/30 (hidróxido de sódio a 4,5% por 30 minutos de autoclave).

Tabela 22 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	1,005909	0,014347	70,11083
Concentração H_2SO_4 % (Linear)	-0,035000	0,037329	-0,93762
Tempo em minutos (Linear)	0,022727	0,036470	0,62317
Concentração H_2SO_4 x Tempo	0,125000	0,037329	3,34863

Fonte: Dados do autor

Analisando a Tabela de efeitos (Tabela 22) após hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon, observa-se que o fator tempo e a interação exercem efeito positivo sobre a resposta, e a análise de variância (Tabela 23) mostra que a interação tem influência

significativa ($P < 0,05$) sobre a concentração de glicose, e R^2 mostra que 80% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 10).

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon

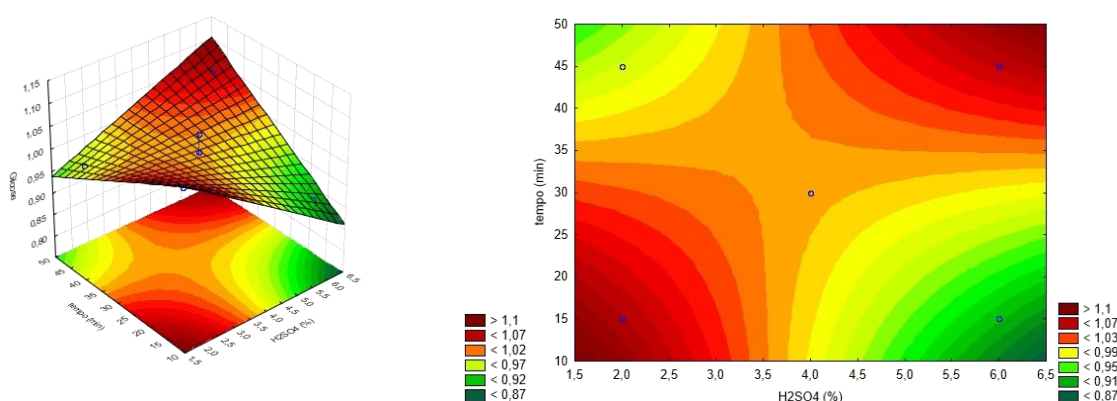
	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,001225	1	0,001225	0,87912	0,417611
Y	0,000541	1	0,000541	0,38834	0,577337
X.Y	0,015625	1	0,015625	11,21330	0,044104
Erro	0,004180	3	0,001393		
Total	0,021571	6			

R^2 0,80621; R^2 ajustado 0,61242

Fonte: Dados do autor

Equação 10. $Z = 1,232 - 0,063X - 0,005Y + 0,001XY$ (10)

Gráfico 3 – Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon



Fonte: Dados do autor

De acordo com a superfície de reposta e gráfico de contorno (Gráfico 3) gerados, existe uma tendência de processo, onde o aumento da concentração de reagente e tempo favorece a liberação de glicose assim como a menor concentração de reagente por um período de tempo mais curto, mostrando que os dois fatores influenciam na resposta quando são alterados para mais ou menos.

Tabela 24 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	1,411364	0,014183	99,51332
Concentração H ₂ SO ₄ % (Linear)	-0,050000	0,036900	-1,35501
Tempo em minutos (Linear)	0,039091	0,036052	1,08430
Concentração H ₂ SO ₄ x Tempo	0,170000	0,036900	4,60704

Fonte: Dados do autor

O mesmo acontece para xilose, a interação exerce efeito positivo (Tabela 24) e também tem influência significativa ($P < 0,05$) sobre a resposta de acordo com a análise de variância (Tabela 25), sendo que 88% da variabilidade das respostas podem ser explicada pelo modelo (Equação 11).

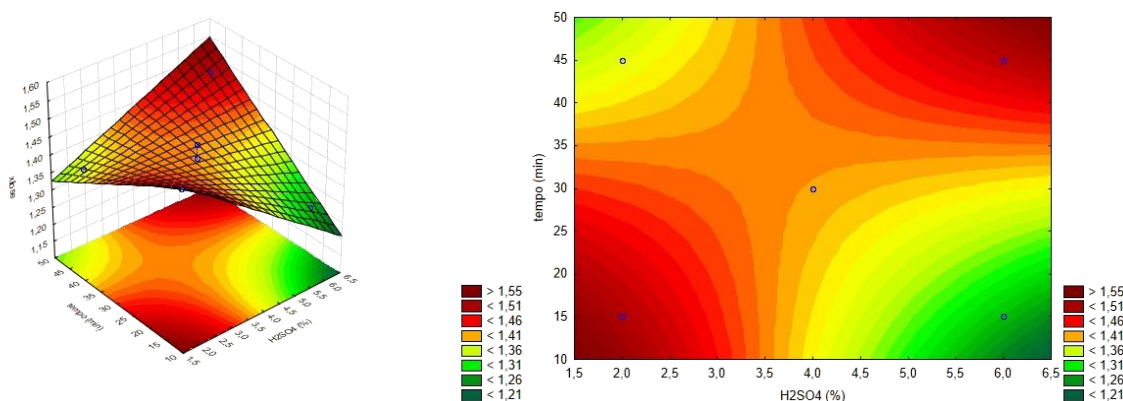
Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise da casca de uva Cabernet Sauvignon

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,002500	1	0,002500	1,83605	0,268418
Y	0,001601	1	0,001601	1,17571	0,357591
X.Y	0,028900	1	0,028900	21,22478	0,019233
Erro	0,004085	3	0,001362		
Total	0,037086	6			

R^2 0,88985; R^2 ajustado 0,77971

Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 11. } Z = 1,712 - 0,083X - 0,006Y + 0,001XY \quad (11)$$

Gráfico 4 – Concentração da xilose em função da concentração de H₂SO₄ e tempo de tratamento após a hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon

Fonte: Dados do autor

As Tabelas 26 e 27 apresentam a estimativa dos efeitos e a análise de variância (ANOVA) da variável resposta glicose após a hidrólise ácida do bagaço de cana

pré-hidrolisado na condição de 4,5/30 (hidróxido de sódio a 4,5% por 30 minutos de autoclave).

Tabela 26 – Efeitos e interações calculadas para a variável glicose após hidrólise do bagaço de cana

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	1,074091	0,023253	46,19172
Concentração H ₂ SO ₄ % (Linear)	-0,005000	0,060499	-0,08265
Tempo em minutos (Linear)	-0,042727	0,059108	-0,72287
Concentração H ₂ SO ₄ x Tempo	0,075000	0,060499	1,23969

Fonte: Dados do autor

A interação exerce efeito positivo (Tabela 26) sobre a resposta, enquanto que os fatores exercem efeito negativo, ou seja, o aumento ou diminuição de um fator diminui a concentração de glicose.

Tabela 27 – Análise de variância (ANOVA) para a variável glicose após hidrólise do bagaço de cana

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,000025	1	0,000025	0,006830	0,939338
Y	0,001913	1	0,001913	0,522541	0,522019
X.Y	0,005625	1	0,005625	1,536843	0,303223
Erro	0,010980	3	0,003660		
Total	0,018543	6			

R²0,40784; R²ajustado 0

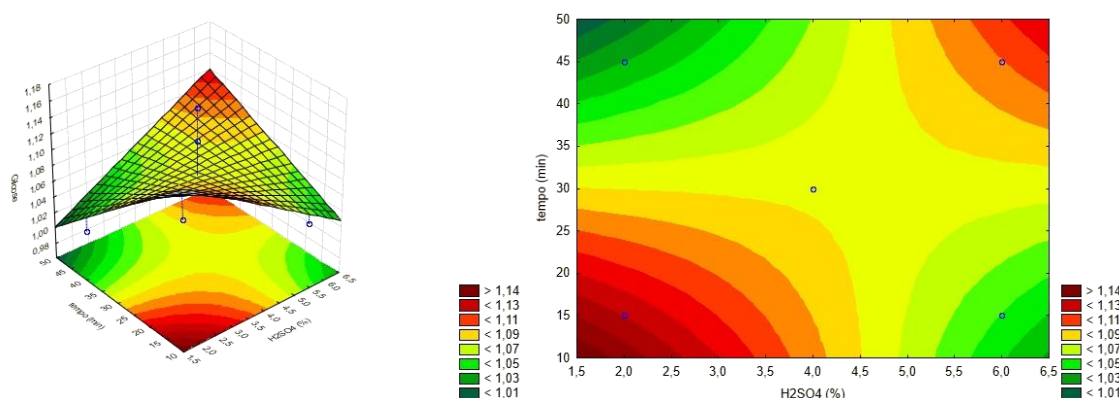
Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 12. } Z = 1,234 - 0,033X - 0,004Y + 0,001XY \quad (12)$$

A análise de variância (Tabela 27) mostra que tanto os fatores quanto a interação não apresentam influência significativa e apenas 40% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 12), mesmo assim foi gerada a superfície de resposta e gráfico de contorno que indicam a tendência de processo.

De acordo com o Gráfico 5, a concentração de glicose diminui ao passo que são utilizadas baixas concentrações de ácido com um tempo de residência longo, assim também acontece quando a concentração do ácido é alta e o tempo é curto. As melhores respostas são encontradas quando os fatores estão nas menores concentrações e tempo ou maiores concentrações e tempo.

Gráfico 5 – Concentração da glicose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida do bagaço de cana



Fonte: Dados do autor

O mesmo resultado é encontrado ao analisar a variável resposta xilose, somente a interação exerce efeito positivo (Tabela 28). A análise de variância não apresenta diferença significativa em relação aos fatores ou interação (Tabela 29) e 41% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 13).

Tabela 28 – Efeitos e interações calculadas para a variável xilose após hidrólise do bagaço de cana

	Efeito	Erro Puro	t(3)
Média	1,586818	0,038641	41,06617
Concentração H_2SO_4 % (Linear)	-0,040000	0,100534	-0,39788
Tempo em minutos (Linear)	-0,004545	0,098222	-0,04628
Concentração H_2SO_4 x Tempo	0,140000	0,100534	1,39256

Fonte: Dados do autor

Tabela 29 – Análise de variância (ANOVA) para a variável xilose após hidrólise do bagaço de cana

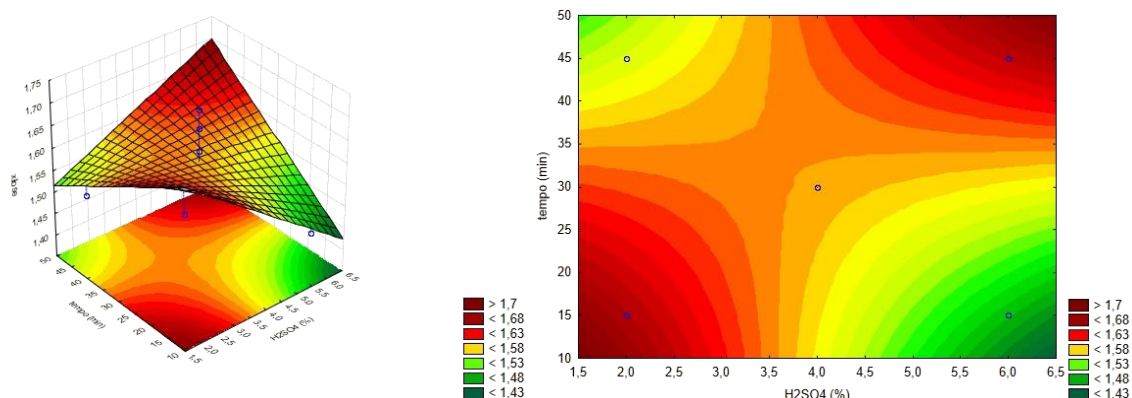
	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,001600	1	0,001600	0,158305	0,717343
Y	0,000022	1	0,000022	0,002142	0,965998
X.Y	0,019600	1	0,019600	1,939236	0,258015
Erro	0,030321	3	0,010107		
Total	0,051543	6			

R^2 0,41173; R^2 ajustado 0

Fonte: Dados do autor

Equação 13. $Z = 1,86 - 0,06X - 0,01Y + 0,001XY$ (13)

Gráfico 6 – Concentração da xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento após a hidrólise ácida do bagaço de cana



Fonte: Dados do autor

Para xilose, a superfície e o gráfico de contorno (Gráfico 6) mostram que o aumento da concentração do reagente e tempo aumentam a concentração da variável resposta, o mesmo acontece quando o tempo e o reagente estão nas faixas mais baixas.

Para confirmar se a pré-hidrólise melhora a eficiência da hidrólise, foram feitos também, testes de hidrólise ácida com ambas as variedades de uvas sem estarem previamente pré-hidrolisadas e realizou-se o mesmo para o bagaço de cana-de-açúcar como controle.

As Tabelas 30 e 31 trazem a concentração de glicose e xilose, das uvas Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, respectivamente, hidrolisadas sem antes sofrer a pré-hidrólise alcalina.

Como pode ser observada na Tabela 30, a melhor condição de hidrólise ácida da uva Cabernet Franc foi a 2/45, diferentemente do bagaço de cana que apresentou maior concentração de açúcares na condição de 2/15.

Tabela 30 - Concentração de glicose e xilose da hidrólise ácida da uva Cabernet Franc não pré-hidrolisada.

Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	Tempo de Hidrólise (min)	Concentração Média de Glicose (g L ⁻¹)		Concentração Média de Xilose (g L ⁻¹)	
		Cabernet	Cana-de-	Cabernet	Cana-de-
		Franc	açúcar	Franc	açúcar
2	15	0,43 ± 0,084 Ba	1,10 ± 0,047 Bb	0,62 ± 0,084 Ca	1,53 ± 0,047 Bb
	45	0,46 ± 0,055 Ba	1,01 ± 0,055 ABb	0,65 ± 0,055 Ca	1,43 ± 0,055 Bb
4	30	0,43 ± 0,058 Ba	0,94 ± 0,051 Ab	0,63 ± 0,058 Ca	1,12 ± 0,051 Ab
	15	0,20 ± 0,052 Aa	1,02 ± 0,049 ABb	0,29 ± 0,052 Ba	1,44 ± 0,049 Bb
6	45	0,19 ± 0,043 Aa	0,97 ± 0,055 Ab	0,17 ± 0,043 Aa	1,01 ± 0,055 Ab

(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

Fonte: Dados do autor

Para a uva Cabernet Sauvignon (Tabela 31), a condição de hidrólise que resultou em maior concentração de açúcares foi a 2/15, o que pôde ser observado também na hidrólise do bagaço de cana. Entretanto pode-se notar que o tempo não tem influência no processo enquanto que a concentração de ácido pode influenciar na resposta até a concentração de 4,5%.

A realização da pré-hidrólise alcalina aumentou em média 35% e 74% a concentração de açúcares na hidrólise ácida das uvas Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, respectivamente, no bagaço de cana-de-açúcar o aumento foi de 69%, em média. De acordo com Baudel (2006), a aplicação do pré-tratamento alcalino que envolve temperaturas e pressões moderadas e tem por finalidade remover a lignina, aumenta a superfície da biomassa, deixando a camada de hemicelulose intacta e reduz a cristalinidade da celulose, dessa forma ocorrendo maior liberação de açúcares na etapa de hidrólise.

Tabela 31 - Concentração de glicose e xilose da hidrólise ácida da uva Cabernet Sauvignon não pré-hidrolisada.

Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	Tempo de Hidrólise (min)	Concentração Média de		Concentração Média de	
		Glicose		Xilose	
		(gL ⁻¹)		(gL ⁻¹)	
		Cabernet Sauvignon	Cana-de- açúcar	Cabernet Sauvignon	Cana-de- açúcar
2	15	0,97 ± 0,053	1,10 ± 0,047	1,38 ± 0,053	1,53 ± 0,047
		Da	Bb	Da	Bb
	45	0,80 ± 0,059	1,01 ± 0,055	1,13 ± 0,059	1,43 ± 0,055
		BCa	ABb	Ca	Bb
4	30	0,69 ± 0,048	0,94 ± 0,051	0,98 ± 0,048	1,12 ± 0,051
		Ba	Ab	Ba	Ab
6	15	0,82 ± 0,057	1,02 ± 0,049	1,15 ± 0,057	1,44 ± 0,049
		Ca	ABb	Ca	Bb
	45	0,41 ± 0,054	0,97 ± 0,055	0,58 ± 0,054	1,01 ± 0,055
		Aa	Ab	Aa	Ab

(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (Tukey, P > 0,05).

Fonte: Dados do autor

A uva Cabernet Sauvignon foi a que apresentou maior concentração de açúcares em todos os tratamentos realizados - pré-hidrólise alcalina e nas hidrólises ácidas com ou sem pré-hidrólise - quando comparada com a uva Cabernet Franc. A substituição da casca pelo bagaço levou ao aumento de 11% na concentração de xilose com diferença significativa (P<0,05). Entretanto na liberação de glicose, o aumento de 7,7% não foi considerado significativo (P>0,05), mostrando que a casca de uva Cabernet Sauvignon também tem potencial para extração de açúcares fermentescíveis a partir de pré-tratamento e hidrólise.

5.2 Parte 2 – Açúcares obtidos de pré-tratamentos ácidos ou alcalinos em autoclave e hidrólise ácida da casca de uva Cabernet Sauvignon

5.2.1 Pré-tratamento ácido e hidrólise ácida

A concentração de 7% de ácido fosfórico (H_3PO_4) durante o pré-tratamento da casca de uva resultou nas maiores concentrações médias de açúcares redutores, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado às menores concentrações (Tabela 32). Quanto ao tempo de tratamento, a maior média obtida dos açúcares foi em 15 minutos, entretanto não houve diferença significativa para as médias dos outros tempos testados. Considerando redução no custo energético do processo, o melhor tempo de tratamento seria a 15 minutos, utilizando 7% de ácido.

Gámez et al. (2006) encontraram o melhor resultado de açúcares redutores (23,1 g de açúcar redutor L^{-1}) na hidrólise ácida do bagaço de cana realizada nas condições de 4% de H_3PO_4 por 300 minutos a 122 °C. Tal diferença em relação ao atual trabalho deve-se ao tempo de exposição do material a hidrólise além da diferença estrutural das duas matérias-primas.

Tabela 32 - Concentração de açúcares redutores g L^{-1} obtidos após pré-tratamento ácido e hidrólise ácida.

Concentração ácida(%)	Tempo (minutos)					
	15		30		45	
	M	DP	M	DP	M	DP
2,0	2,40 ± 0,27		2,78 ± 0,05		1,40 ± 0,66	
	A ¹ ab ²		Ab		Aa	
4,5	4,11 ± 0,40		2,44 ± 0,24		4,74 ± 0,16	
	Bb		Aa		Bb	
7,0	5,65 ± 0,20		5,24 ± 0,23		5,51 ± 0,22	
	Ca		Ba		Ba	

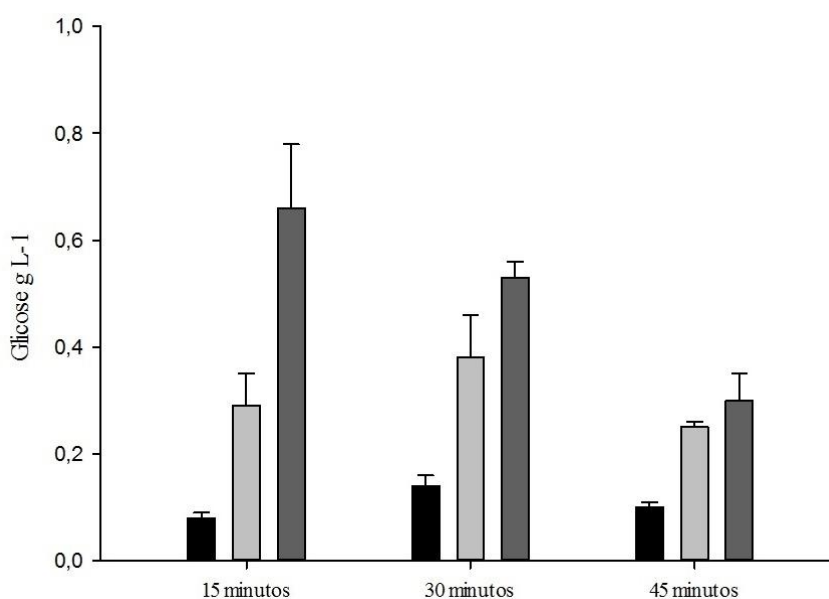
(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si, fixado o tempo (Tukey, $P > 0,05$).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si, fixada a concentração (Tukey, $P > 0,05$).

Fonte: Dados do autor

De acordo com o Gráfico 7, a melhor condição de pré-tratamento ácido para liberação de glicose foi também o tempo de 15 minutos com concentração de 7%, liberando 0,66 g de glicose L⁻¹. Ao analisar estatisticamente a concentração de ácido empregada, os ensaios com 7% foram significativamente mais efetivos (Tukey, $P < 0,05$), enquanto que, ao compararmos o tempo de tratamento, o experimento em que se utilizou 15 minutos não diferiu estatisticamente do de 30 minutos ($P > 0,05$), o que mais uma vez ressalta a possível economia no processo.

Gráfico 7 - Concentração de glicose após o pré-tratamento com H₃PO₄ e hidrólise ácida



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%
 Fonte: Dados do autor

Martin et al. (2007), utilizando ácido sulfúrico para pré-tratamento do bagaço de cana, a 122°C, nos tempos de 20 minutos, 40 minutos e 60 minutos, obtiveram 2,1 g, 3,7 g e 4,0 g de glicose L⁻¹, respectivamente. Em relação ao atual trabalho, observa-se um ganho em relação à diferença do tempo de incubação dos ensaios. Além disso, no atual trabalho utilizou-se ácido fosfórico, tão eficiente quanto o ácido sulfúrico, porém mais barato e seguro (GÁMEZ et al., 2006).

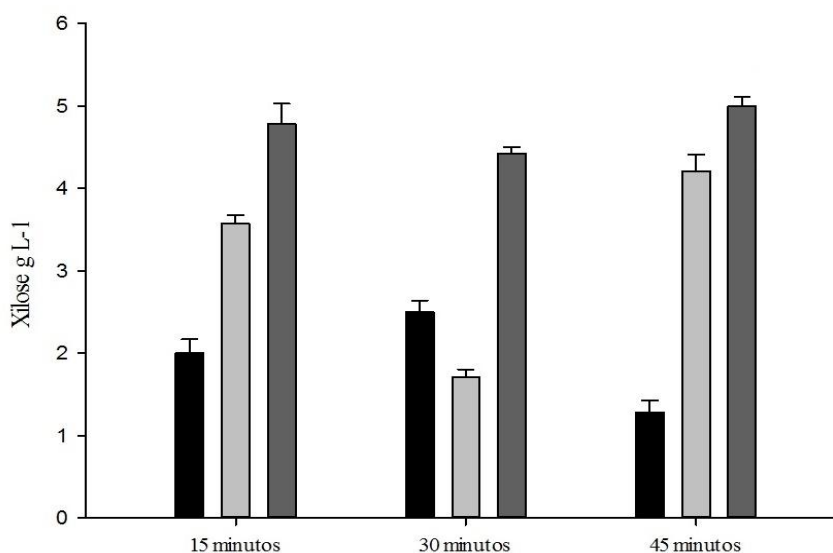
Schirmer-Michel et al. (2008) verificaram a eficiência da hidrólise ácida na casca de soja utilizando 1,4% de ácido sulfúrico à 125 °C por 1 hora e obtiveram 0,38 g de

glicose L^{-1} . Estes resultados mostram que no atual trabalho o rendimento foi maior em 73,6%.

Os maiores tempos de pré-tratamento empregados nas duas pesquisas e uma menor concentração de ácido levou à menor liberação de açúcar quando comparada aos resultados do Gráfico 7. Estes dados puderam mostrar que a maior concentração do ácido foi mais eficiente na liberação de glicose do que o tempo de tratamento, podendo representar menor gasto energético no processo.

Quanto à liberação de xilose, nota-se que a maior média foi 5,0 g de xilose L^{-1} , resultante do ensaio concentração de 7% de ácido fosfórico durante 45 minutos (Gráfico 8). Mais uma vez o aumento da concentração de ácido utilizada no pré-tratamento da casca de uva esteve relacionado com o aumento significativo (Tukey, $P < 0,05$) na concentração de açúcares. Entretanto, o aumento do tempo de permanência em alta temperatura deste material não favoreceu estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$) a concentração de xilose, indicando que o emprego de 15 minutos seria, mais uma vez, o mais favorável para reduzir o custo energético do processo.

Gráfico 8 - Concentração de xilose após o pré-tratamento com H_3PO_4 e hidrólise ácida



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

Analisando outros resultados do experimento, percebe-se que as concentrações de 7% de ácido fosfórico, durante 15 e 30 minutos, liberaram concentrações

bem próximas ao máximo encontrado. O tempo de permanência pode ser fator primordial para identificar a melhor condição, sendo o ensaio submetido a 15 minutos o mais adequado, pois atribui agilidade ao processo e diminuição de custos.

Egüés et al. (2013) estudaram a auto-hidrólise da casca de uva em autoclave com tempo de residência de 2 horas e posterior tratamento com ácido sulfúrico 2%, e encontraram 9,27 g de xilose L⁻¹. O maior rendimento de açúcar obtido por estes autores mostra que a auto-hidrólise poderia ser uma forma de pré-tratamento mais eficiente na liberação do açúcar, entretanto, o longo tempo de tratamento utilizado por tais pesquisadores aumentaria o custo energético do processo.

Roberto, Mussato e Rodrigues (2003) relataram que o melhor resultado para a liberação de xilose foi obtido a uma concentração de ácido sulfúrico de 1,6%, em 30 minutos de pré-tratamento da palha de arroz, o que rendeu 20,5 g L⁻¹ de xilose. Estes tempos de pré-tratamento geraram resultados superiores em até 4,1 vezes aos empregados no atual trabalho. No entanto, os autores utilizam alta pressão do reator. Kiipper (2009) obteve como resultado em seu trabalho que o melhor tratamento para liberação de xilose ocorreu na concentração 1% de ácido sulfúrico, nos tempos de 60 minutos e 120 minutos, gerando 7,13 e 7,07 g de xilose L⁻¹, respectivamente, sendo que em 30 minutos de tratamento, o rendimento de liberação de xilose encontrado por Kiipper (2009) foi 18% menor ao mostrado no Gráfico 8. Comparando com outras hidrólises ácidas, Aguilar et al. (2002), ao utilizarem ácido sulfúrico 2% a 122 °C, encontraram 21,6 g de xilose L⁻¹ e 3,0 g de glicose L⁻¹, sendo a matéria-prima o bagaço de cana. Estes resultados apontam que os tipos diferentes de matérias-primas e processos podem determinar diferenças nos rendimentos de açúcares.

Quando a casca de uva foi submetida a um pré-tratamento ácido nota-se que a liberação de xilose foi maior do que a de glicose. Segundo Canettieri (2002), a hidrólise ácida da biomassa produz maior quantidade de xilose comparado com a glicose, já que esta pentose é proveniente de xilana facilmente degradada por ácidos, devido sua estrutura amorfa, enquanto que a glicose é proveniente da celulose que possui estrutura cristalina e para ser degradada necessita de condições de processo mais severas (NEUREITER et al., 2002; CHENG et al., 2008).

5.2.2 Pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida

A maior concentração média na obtenção de açúcares fermentescíveis após o pré-tratamento alcalino foi na condição de 4,5% de NaOH, 45 minutos com 8,9 g de açúcares redutores L^{-1} , não sendo esta média significativamente maior quando considerada as médias dos outros tempos de tratamento (Tabela 33). Entretanto, a Tabela 33 mostra que a fixação do tempo e o aumento da concentração de álcali empregada no processo de 2,0% a 4,5% favorecem significativamente a liberação de açúcares.

Tabela 33 - Concentração de açúcares redutores $g L^{-1}$ obtidos após pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida

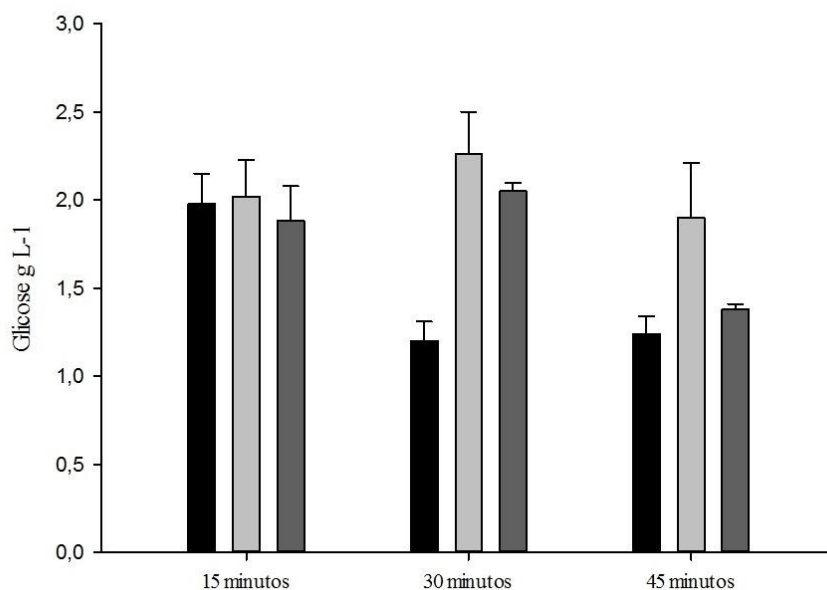
Concentração alcalina (%)	Tempo (minutos)					
	15		30		45	
	M	DP	M	DP	M	DP
2,0	6,91 ± 0,12		7,76 ± 1,01		6,05 ± 0,04	
	A ¹ a ²		Aa		Ba	
4,5	7,45 ± 0,10		8,63 ± 0,09		8,90 ± 0,35	
	Ba		Aa		Ca	
7,0	7,12 ± 0,13		6,89 ± 0,52		5,13 ± 0,21	
	Ab		Ab		Aa	

(1) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si, fixado o tempo (Tukey, $P > 0,05$).

(2) Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si, fixada a concentração (Tukey, $P > 0,05$).

Fonte: Dados do autor

Dentre os ensaios realizados, utilizando o pré-tratamento alcalino, a maior concentração média obtida de glicose foi a 4,5% de NaOH, por 30 minutos, com 2,26 g de glicose L^{-1} , como observado no Gráfico 9. Analisando estes dados estatisticamente não há diferença (Tukey, $P > 0,05$) em relação ao tratamento em que se usou menor tempo (15 minutos) e menor concentração de NaOH. Levando-se em consideração a relação custo-benefício, esta condição foi favorável por empregar menor tempo e concentração de álcali podendo gerar uma economia no processo.

Gráfico 9 - Concentração de glicose após o pré-tratamento com NaOH e hidrólise ácida

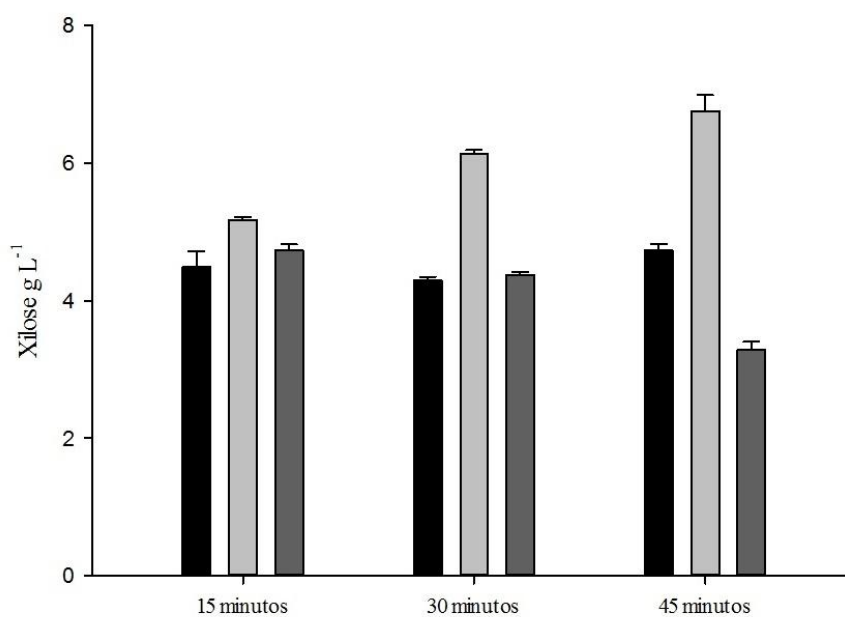
Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

A maior média de liberação de xilose foi a 4,5% de NaOH, em 45 minutos, com o rendimento de 6,76 g L⁻¹ (Gráfico 10), sendo este ensaio estatisticamente diferente (Tukey, $P < 0,05$) de qualquer outro em relação a concentração de xilose. Entretanto, considerando que para fermentação etanólica a xilose é um açúcar secundário por não ser priorizada metabolicamente pelas leveduras, poderia ser adotado o tratamento 4,5% e álcali por 15 minutos, já que neste não há diferença significativa para outros tratamentos na liberação de glicose e açúcares redutores.

Carrion e Dorta (2009) também realizaram pré-tratamento alcalino e hidrólise ácida utilizando o bagaço de cana como matéria-prima, entretanto no ensaio com ácido sulfúrico a 6%, a 122°C por 1 hora, o resultado obtido foi de 3,65 g de xilose L⁻¹ e 9,90 g de glicose L⁻¹. Sousa (2014) realizou pré-tratamento alcalino utilizando 1, 10 e 20% de NaOH em bagaço-de-cana seguido de hidrólise ácida diluída 0,07% de H₂SO₄ a 120°C por 90 minutos, sendo que o melhor resultado obtido por este autor foi com 1% de álcali no pré-tratamento com rendimento de 0,66 e 0,22 g de glicose e xilose L⁻¹, respectivamente. Rocha et al. (2012) evidenciam que, mesmo em condições suaves, o pré-tratamento alcalino utilizado pode causar uma perda substancial de celulose. Estes resultados indicam que a concentração de reagente utilizada no pré-tratamento, bem como as condições de hidrólise e de matérias-primas, são fatores que afetam diretamente o rendimento dos açúcares fermentescíveis.

Gráfico 10 - Concentração de xilose após o pré-tratamento com NaOH e hidrólise ácida



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

Para a casca de uva, os pré-tratamentos químicos com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio empregados antes da hidrólise ácida em autoclave mostraram bom potencial na liberação de açúcares fermentescíveis.

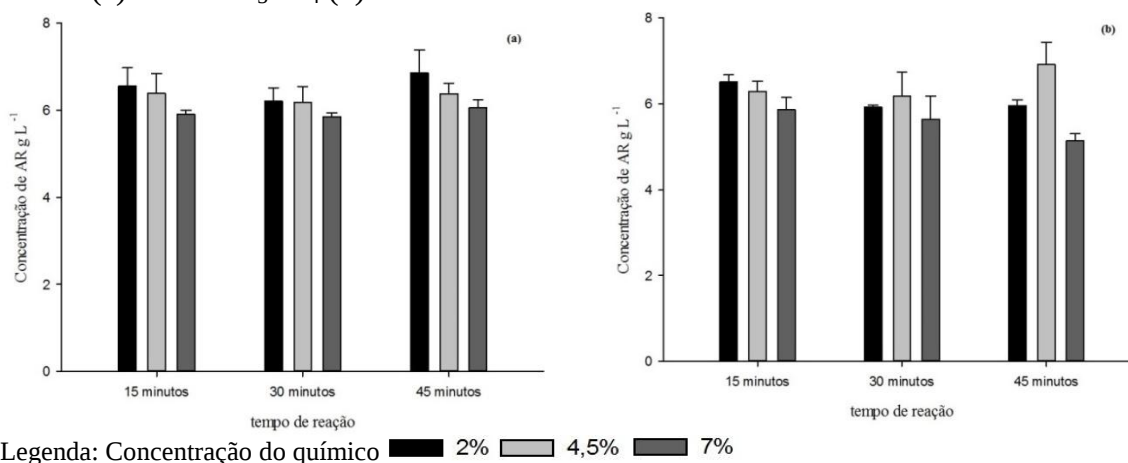
5.3 Parte 3 Pré-tratamento da casca de uva utilizando como pré-tratamentos físicos autoclave, micro-ondas ou ultrassom

5.3.1 Açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em autoclave associado à hidrólise ácida

O gráfico 11 mostra os resultados obtidos em açúcares redutores (AR) após pré-tratamento ácido ou alcalino e hidrólise ácida. A condição que apresentou a melhor resposta foi utilizando H_3PO_4 a 4,5% por 45 minutos, com $6,91 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto não foi estatisticamente diferente (Tukey, $P>0,05$) da condição H_3PO_4 a 2% por 15 minutos ($6,50 \text{ g L}^{-1}$). O mesmo acontece para o tratamento com NaOH, onde o tratamento com melhor resultado ($6,85 \text{ g L}^{-1}$) na condição NaOH 2% por 45 minutos não foi estatisticamente diferente (Tukey, $P>0,05$) do tratamento 2% por 15 minutos ($6,55 \text{ g L}^{-1}$).

Em seu experimento Kiipper (2009) obteve $7,65 \text{ g L}^{-1}$ de AR após tratar o bagaço de cana com 2% de ácido sulfúrico por 60 minutos. Levando em consideração que o reagente utilizado no atual trabalho é um ácido mais fraco e o tempo de residência do experimento foi menor, a casca de uva apresentou boas concentrações de açúcar liberado.

Gráfico 11 - Concentração de açúcares redutores (AR) g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave



A Tabela 34 mostra a conversão do substrato em açúcares redutores. A melhor conversão aconteceu com tratamento por H_3PO_4 4,5% em 45 minutos com $0,69 \text{ g}$ de AR por g^{-1} de casca de uva. Entretanto, não difere estatisticamente do tratamento com NaOH 2% por 15 minutos com $0,66 \text{ g}$ de AR por g^{-1} de casca.

Cara et al. (2007) estudaram a conversão de resíduos de oliveira a açúcares com pré-tratamento ácido e, posterior, hidrólise enzimática e encontraram $36,3 \text{ g}$ açúcar por

100 g⁻¹ de bagaço. López-Linares et al. (2013) avaliaram a obtenção de açúcares após pré-tratamento ácido (0,32 % H₃PO₄) e hidrólise enzimática de resíduos de colza e obtiveram como resultado 41,1 g de açúcar por 100 g⁻¹ de resíduos de colza. Tais resultados mostram que a conversão em açúcares da casca de uva encontrada no atual estudo é superior em 33% e 28% respectivamente, quando comparada a estes autores.

Tabela 34 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em autoclave seguido de hidrólise ácida

Químico %	Tempo de reação (min)	Conversão YS (g g ⁻¹) ¹
NaOH 2%	15	0,66
	30	0,62
	45	0,68
NaOH 4,5%	15	0,63
	30	0,61
	45	0,64
NaOH 7%	15	0,59
	30	0,58
	45	0,60
H ₃ PO ₄ 2%	15	0,65
	30	0,59
	45	0,59
H ₃ PO ₄ 4,5%	15	0,62
	30	0,61
	45	0,69
H ₃ PO ₄ 7%	15	0,58
	30	0,56
	45	0,51

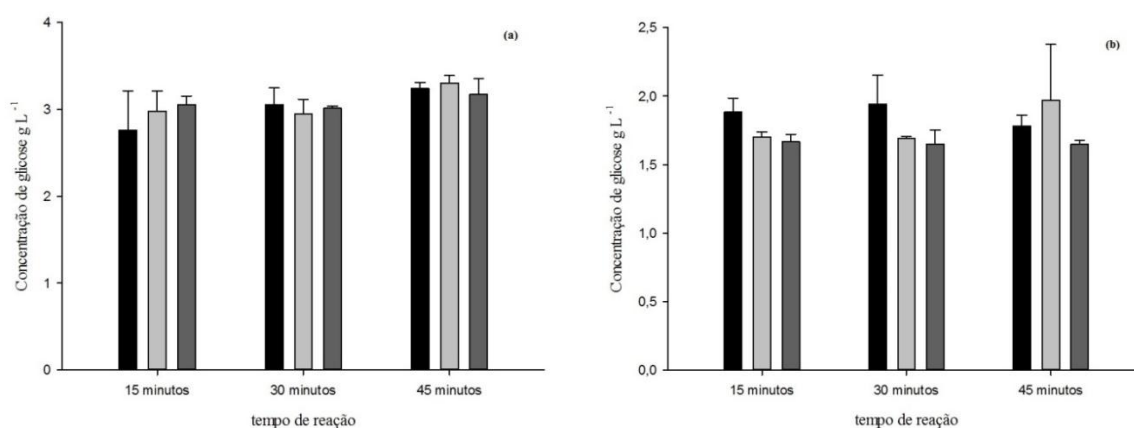
¹YS= Conversão de substrato em açúcares redutores (g g⁻¹)

Fonte: Dados do autor

No Gráfico 12, é apresentada a concentração de glicose dos ensaios utilizando NaOH ou H₃PO₄ seguido da hidrólise ácida. Os experimentos utilizando NaOH foram estatisticamente superiores (Tukey, P<0,05) em relação a todos os experimentos com H₃PO₄. O melhor resultado foi encontrado na condição de 4,5% de NaOH por 45 minutos (3,30g L⁻¹). Entretanto tal condição não difere estatisticamente (Tukey, P>0,05) do experimento com 4,5% de NaOH por 15 minutos.

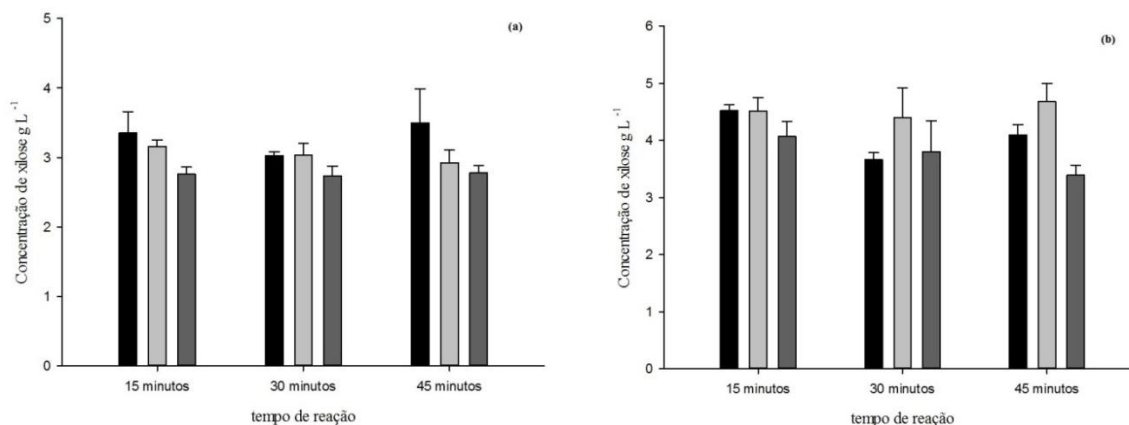
Cheng et al. (2008) encontraram após a hidrólise ácida (1,25% H_2SO_4 , 121°C, 2 horas) do bagaço de cana 9,2 g de glicose L^{-1} no primeiro estágio do processo, resultado superior ao encontrado no atual trabalho, entretanto, o tempo de residência na autoclave foi maior, além disso a matéria-prima utilizada era diferente. Alguns pesquisadores retratam que o aumento do tempo pode favorecer a hidrólise, ao mesmo tempo em que pode gerar compostos inibitórios da fermentação como furfural e hidroximetilfurfural (LASER et al., 2002; CANILHA; SILVA; SOLENZAL, 2004).

Gráfico 12 - Concentração de glicose g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave



Com relação à xilose, os resultados são apresentados no Gráfico 13. A maior concentração de xilose foi obtida no ensaio utilizando 4,5% de H_3PO_4 por 45 minutos com 4,68 g L^{-1} de AR, valor este estatisticamente diferente (Tukey, $P < 0,05$) de qualquer ensaio empregando NaOH, cujo melhor tratamento foi 2% por 45 minutos. Entretanto, o melhor resultado (4,5% de H_3PO_4 por 45 minutos) não difere estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$) do tratamento com 2% H_3PO_4 por 15 minutos (4,52 g L^{-1}), corroborando com o resultado encontrado por Mamman et al. (2008) que afirmam que as hemiceluloses são mais facilmente hidrolisadas em meio ácido e em altas temperaturas do que a celulose.

Gráfico 13 - Concentração de xilose g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em autoclave



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

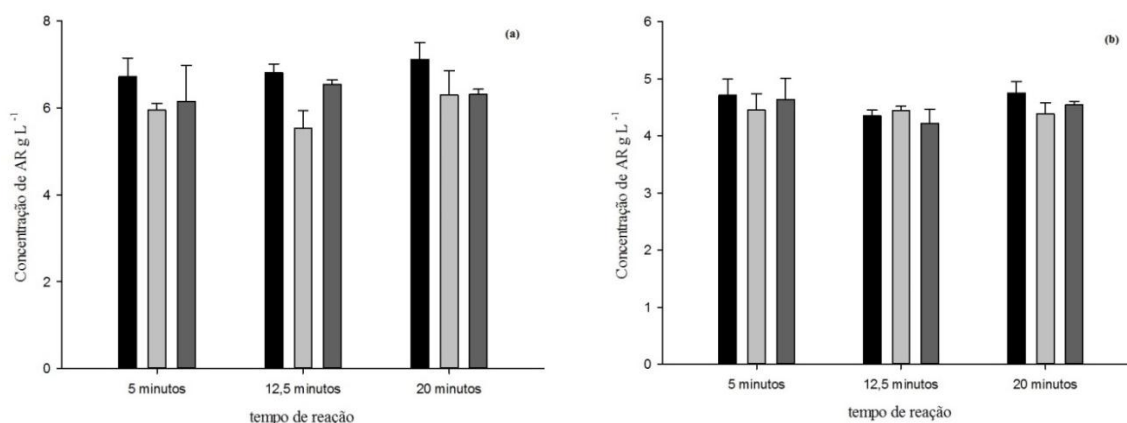
De acordo com os dados obtidos, é possível notar que, independente do açúcar, o fator tempo não foi determinante para o resultado e que, sendo assim, utilizar o menor tempo trará uma redução do gasto energético do processo. Além disso, em alguns casos, também é possível reduzir a concentração do reagente sem afetar negativamente o resultado, tendo como base a análise estatística do experimento.

5.3.2 Açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em micro-ondas associado à hidrólise ácida

O Gráfico 14 apresenta os resultados em AR após os ensaios com H_3PO_4 e NaOH e hidrólise ácida. A melhor concentração de AR foi obtida no ensaio com 2% de hidróxido de sódio por 20 minutos com $7,12 \text{ g L}^{-1}$, resultado este que não difere estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$) do tratamento NaOH 2% a 5 minutos ($6,72 \text{ g L}^{-1}$).

Todos os ensaios realizados com hidróxido de sódio diferem estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$) dos experimentos envolvendo ácido fosfórico como pré-tratamento, cujo melhor resultado foi com 2% de H_3PO_4 por 20 minutos com $4,74 \text{ g L}^{-1}$.

Gráfico 14 - Concentração de açúcares redutores (AR) g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

De acordo com a Tabela 35, a maior conversão da casca de uva em açúcares redutores quando empregado o micro-ondas como pré-tratamento físico foi observada na condição de NaOH 2% a 20 minutos com 0,71 g de AR por g^{-1} de casca de uva. Hu e Wen (2008) estudaram a conversão de *switchgrass* em açúcares utilizando pré-tratamento alcalino em micro-ondas seguido de hidrólise enzimática encontrando 58,7 g de AR por 100 g^{-1} de *switchgrass*. Tal resultado é 12 % inferior ao encontrado no presente estudo, confirmando que a casca de uva tem bom potencial neste tipo de processo.

Tabela 35 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em micro-ondas seguido de hidrólise ácida

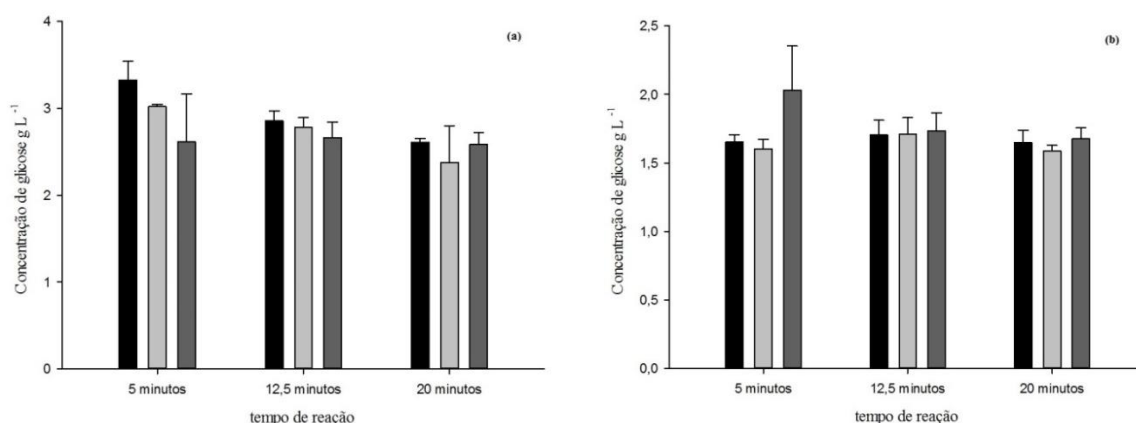
Químico %	Tempo de reação (min)	Conversão YS (g g^{-1}) ¹
NaOH 2%	5	0,67
	12,5	0,68
	20	0,71
NaOH 4,5%	5	0,59
	12,5	0,55
	20	0,63
NaOH 7%	5	0,61
	12,5	0,65
	20	0,63
H ₃ PO ₄ 2%	5	0,47
	12,5	0,43
	20	0,47
H ₃ PO ₄ 4,5%	5	0,45
	12,5	0,44
	20	0,43
H ₃ PO ₄ 7%	5	0,46
	12,5	0,42
	20	0,45

¹YS= Conversão de substrato em açúcares redutores (g g^{-1})

Fonte: Dados do autor

Para glicose (Gráfico 15), o melhor resultado foi com 2% de NaOH por 5 minutos ($3,33 \text{ g L}^{-1}$), sendo este resultado estatisticamente diferente (Tukey, $P < 0,05$) de todos os outros experimentos, incluindo as outras condições envolvendo hidróxido de sódio.

Gráfico 15 - Concentração de glicose g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas



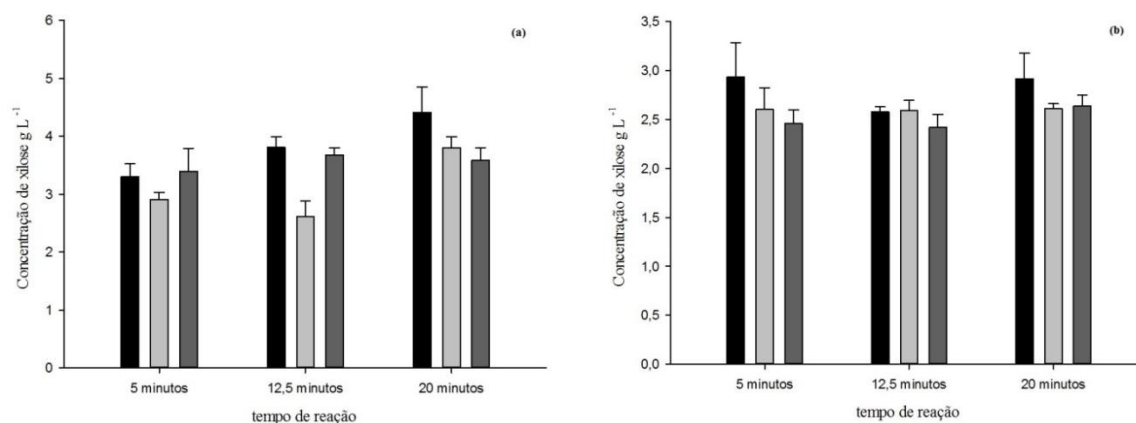
Legenda: Concentração do químico 2% 4,5% 7%

Fonte: Dados do autor

A concentração de xilose (Gráfico 16) foi maior no tratamento com NaOH 2% por 20 minutos com $4,41 \text{ g L}^{-1}$, resultado este estatisticamente diferente (Tukey, $P < 0,05$) de todas as outras condições, com exceção dos ensaios com NaOH 2% por 12,5 minutos e 4,5% por 20 minutos com 3,81 e $3,79 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tukey, $P > 0,05$).

As micro-ondas, com o auxílio do aquecimento melhoram a solubilização das xilanas na fase do pré-tratamento e também a digestibilidade enzimática (HU, WEN, 2008). Tal fato pode ser observado também para o atual experimento, já que o tratamento com micro-ondas melhorou a eficiência da hidrólise ácida, quando comparado à autoclave.

Gráfico 16 - Concentração de xilose g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em micro-ondas



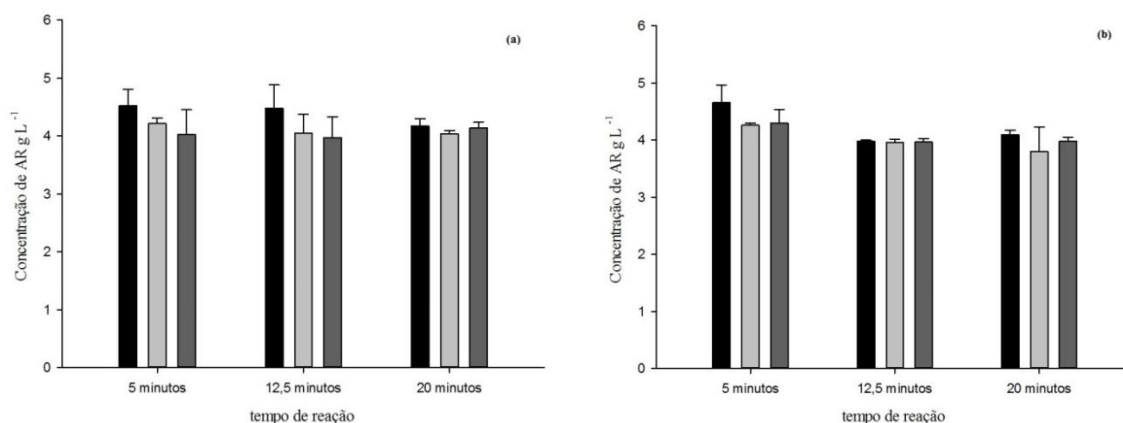
Legenda: Concentração do químico 2% 4,5% 7%

Fonte: Dados do autor

5.3.3 Análise de açúcares após pré-tratamento alcalino ou ácido em ultrassom mais hidrólise ácida

A concentração de açúcares redutores (Gráfico 17) foi maior utilizando ácido fosfórico 2% por 5 minutos com $4,66 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto, este resultado não difere estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$) do tratamento com hidróxido de sódio 2% por 5 minutos ($4,52 \text{ g L}^{-1}$), mostrando que tanto o caráter básico quanto o ácido dos reagentes hidrolíticos contribuíram na mesma intensidade e que aumentar o tempo de reação ou concentração do reagente não favoreceu a concentração de açúcares, tendo como base a análise estatística dos dados.

Gráfico 17 - Concentração de açúcares redutores (AR) g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em ultrassom



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

Lunelli et al. (2014), utilizando ultrassom como pré-tratamento para hidrólise enzimática do bagaço de cana, obtiveram $0,26 \text{ g g}^{-1}$ de bagaço. No atual estudo $0,46 \text{ g g}^{-1}$, ou seja, 77% maior do que o encontrado pelos autores citados, os quais usaram maior tempo de reação.

As concentrações de glicose (Gráfico 18) foram inferiores aos tratamentos com autoclave e micro-ondas independentes do reagente utilizado. O maior valor encontrado foi $1,84 \text{ g de glicose L}^{-1}$ no ensaio com 2% de NaOH por 5 minutos, valor este, não estatisticamente diferente (Tukey, $P > 0,05$) do resultado obtido na melhor condição com H_3PO_4 7% por 5 minutos ($1,78 \text{ g L}^{-1}$).

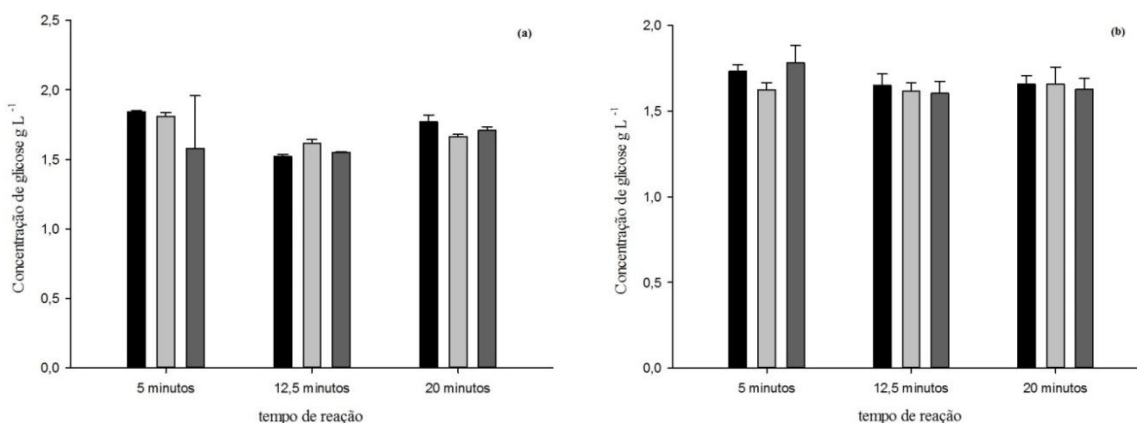
Tabela 36 – Conversão de substrato a açúcares redutores por pré-tratamentos químicos em ultrassom seguido de hidrólise ácida

Químico %	Tempo de reação (min)	Conversão YS ($g\ g^{-1}$) ¹
NaOH 2%	5	0,45
	12,5	0,44
	20	0,41
NaOH 4,5%	5	0,42
	12,5	0,40
	20	0,40
NaOH 7%	5	0,41
	12,5	0,39
	20	0,41
H ₃ PO ₄ 2%	5	0,46
	12,5	0,39
	20	0,40
H ₃ PO ₄ 4,5%	5	0,42
	12,5	0,39
	20	0,38
H ₃ PO ₄ 7%	5	0,42
	12,5	0,39
	20	0,39

¹YS= Conversão de substrato em açúcares redutores ($g\ g^{-1}$)

Fonte: Dados do autor

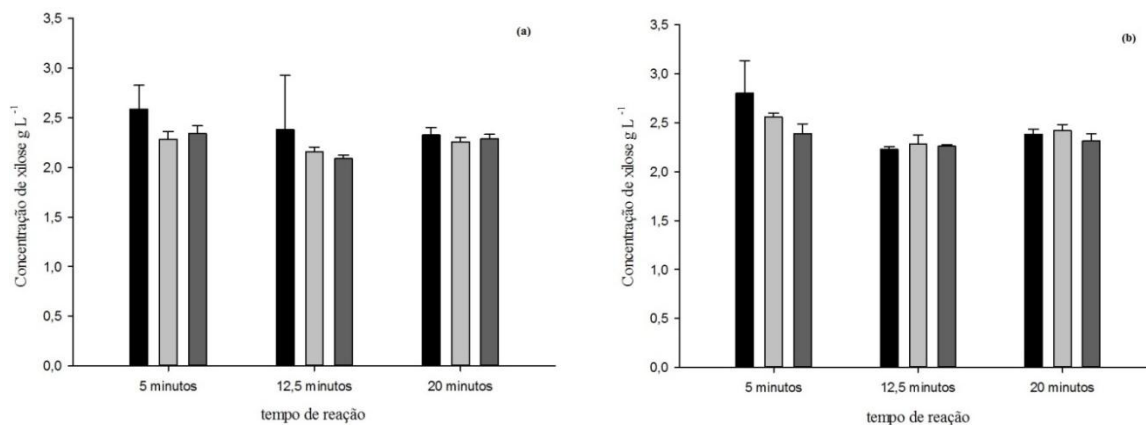
Gráfico 18 - Concentração de glicose $g\ L^{-1}$ após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H₃PO₄ (b) em ultrassom



Fonte: Dados do autor

Para xilose (Gráfico 19), o melhor resultado foi obtido com H₃PO₄ 2% por 5 minutos (2,80 $g\ L^{-1}$), porém este valor não difere estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$) do melhor rendimento obtido com NaOH, no tratamento com 2% por 5 minutos (2,59 $g\ L^{-1}$).

Gráfico 19 - Concentração de xilose g L^{-1} após pré-tratamento alcalino NaOH (a) e ácido H_3PO_4 (b) em ultrassom



Legenda: Concentração do químico ■ 2% ■ 4,5% ■ 7%

Fonte: Dados do autor

Após a análise de todos os experimentos, foi possível selecionar o tratamento com micro-ondas e utilizar NaOH como reagente para a próxima etapa.

5.4 Parte 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para pré-tratamento alcalino em micro-ondas.

5.4.1. Variável resposta Açúcares Redutores (AR) (Parte 4)

Os resultados da avaliação estatística para a variável açúcares redutores (AR) estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37 - Efeitos e interações calculadas para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 4)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	3,088559	0,362900	8,510767
Concentração NaOH % (Linear)	-0,422826	0,444339	-0,951586
Concentração NaOH % (Quadrática)	0,964134	0,529323	1,821448
Tempo em minutos (Linear)	0,246768	0,442226	0,558012
Tempo em minutos (Quadrática)	0,917863	0,521068	1,761504
Concentração NaOH x Tempo	-0,239000	0,628585	-0,380219

Fonte: Dados do autor

Para a variável açúcares redutores, a função linear da concentração de NaOH e a interação entre os fatores concentração de NaOH e tempo exercem efeito negativo sobre a resposta, ou seja, ao aumentar a concentração do reagente, e a presença de interação há uma diminuição da liberação de açúcares. Esse fato pode ocorrer já que os açúcares podem ser degradados quando submetidos a tratamentos mais severos como aumento da concentração de reagentes, e das temperaturas (LASER et al., 2002; CARRION; DORTA, 2009, MILLER et al, 2012).

Embora haja influência dos fatores estudados, a tabela da análise de variância (Tabela 38) mostra que os fatores não foram significativos para a resposta e o valor de R^2 foi baixo, indicando assim que apenas 55% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 14).

Tabela 38 -Análise de variância (ANOVA) para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 4)

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,357787	1	0,357787	0,905515	0,385006
X ²	1,310878	1	1,310878	3,317674	0,128170
Y	0,123031	1	0,123031	0,311377	0,600897
Y ²	1,226016	1	1,226016	3,102898	0,138455
X.Y	0,057121	1	0,057121	0,144566	0,719399
Erro	1,975598	5	0,395120		
Total	4,467031	10			

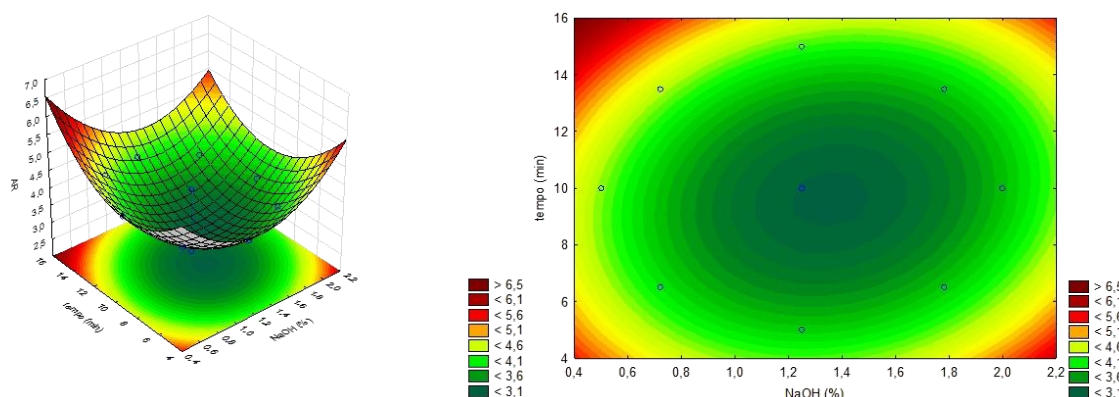
R^2 0,55774; R^2 ajustado 0, 11548

Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 14. } Z = 8,86 - 4,04X + 1,72X^2 - 0,63Y + 0,37Y^2 - 0,64XY \quad (14)$$

Apesar dos dados obtidos não apresentarem resultados significativos, uma superfície de resposta e um gráfico de contorno foram gerados (Gráfico 20) e indicam a tendência do processo.

Gráfico 20 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta açúcares redutores (AR) em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento



Fonte: Dados do autor

Observa-se que, quando há o aumento da concentração do reagente por um período de tempo menor na reação, ocorre o aumento da resposta (açúcares redutores), e o mesmo vale para quando há a diminuição do reagente e o tempo de reação é maior. Entretanto quando se aumenta ou diminui os dois fatores ao mesmo tempo (concentração de NaOH e tempo), a quantidade de açúcar liberado também aumenta, embora seja em menor quantidade.

5.4.2 Variável resposta glicose (Parte 4)

Os resultados dos efeitos e interações dos fatores para a variável resposta glicose estão apresentados na Tabela 39. O fator concentração de NaOH foi o único que apresentou efeito negativo. Portanto, o aumento da concentração do reagente não favorece a variável resposta.

Tabela 39 - Efeitos e interações calculadas para a variável glicose (Parte 4)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	1,063147	0,060742	17,50256
Concentração NaOH % (Linear)	-0,040150	0,074374	-0,53984
Concentração NaOH % (Quadrática)	-0,034232	0,088598	-0,38637
Tempo em minutos (Linear)	0,028177	0,074020	0,38066
Tempo em minutos (Quadrática)	0,023608	0,087217	0,27068
Concentração NaOH x Tempo	0,141500	0,105213	1,34489

Fonte: Dados do autor

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 40) mostra que os fatores nem a interação tiveram influência sobre a resposta e o R^2 0,33846 é baixo, não sendo possível o ajuste do modelo (Equação 15). Mesmo assim foi gerada a superfície de resposta e o gráfico de contorno que indicam a tendência do processo.

Tabela 40 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta glicose (Parte 4)

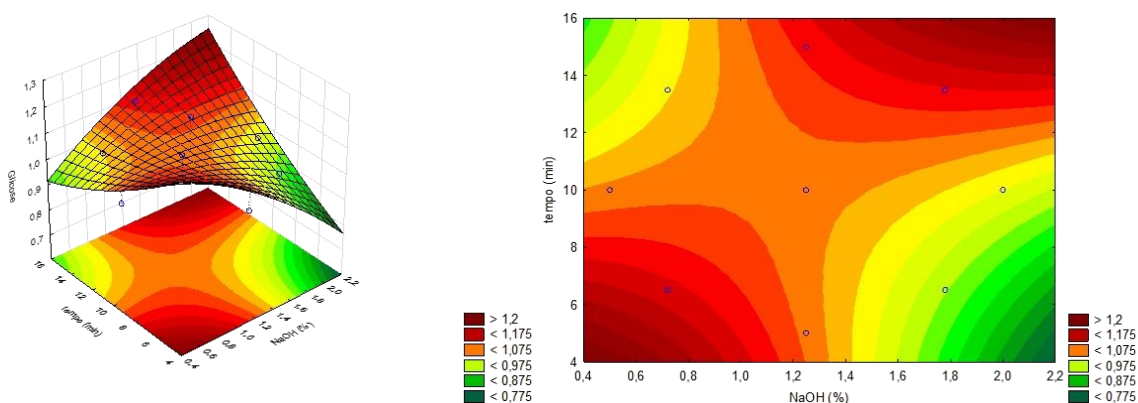
	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,003226	1	0,003226	0,291423	0,612475
X ²	0,001653	1	0,001653	0,149281	0,715118
Y	0,001604	1	0,001604	0,144905	0,719089
Y ²	0,000811	1	0,000811	0,073268	0,797455
X.Y	0,020022	1	0,020022	1,808735	0,236440
Erro	0,055349	5	0,011070		
Total	0,083367	10			

R^2 0,33846; R^2 ajustado 0

Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 15. } Z = 1,55 - 2,67X - 0,06X^2 - 0,06Y + 0,01Y^2 + 0,38XY \quad (15)$$

Gráfico 21 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta glicose em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento



Fonte: Dados do autor

Com o aumento da concentração do reagente e utilizando um tempo maior de reação, a liberação de glicose foi aumentada reiterando a influência positiva da interação dos fatores. O contrário também ocorre, diminuindo a concentração do reagente e do tempo aumenta a resposta.

5.4.3 Variável resposta xilose (Parte 4)

Para a variável resposta xilose, a concentração de NaOH e a interação entre os fatores apresentaram efeito negativo (Tabela 41).

Tabela 41 - Efeitos e interações calculadas para a variável xilose (Parte 4)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	1,902440	0,332721	5,717815
Concentração NaOH % (Linear)	-0,382399	0,407387	-0,938661
Concentração NaOH % (Quadrática)	1,030764	0,485304	2,123953
Tempo em minutos (Linear)	0,251576	0,405451	0,620484
Tempo em minutos (Quadrática)	0,927422	0,477736	1,941285
Concentração NaOH x Tempo	-0,304000	0,576312	-0,527492

Fonte: Dados do autor

Para xilose, os fatores também não apresentaram influência significativa perante a análise de variância (Tabela 42) e o R^2 (0,61329) foi o mais alto analisando as três variáveis respostas. Mesmo assim, considerado baixo, pois o modelo (Equação 16) explica somente 61% da variabilidade das respostas.

Tabela 42 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta xilose (Parte 4)

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,292640	1	0,292640	0,881084	0,390999
X ²	1,498324	1	1,498324	4,511178	0,087068
Y	0,127872	1	0,127872	0,385000	0,562124
Y ²	1,251683	1	1,251683	3,768588	0,109890
X.Y	0,092416	1	0,092416	0,278248	0,620412
Erro	1,660680	5	0,332136		
Total	4,294340	10			

R^2 0,61329; R^2 ajustado 0,22657

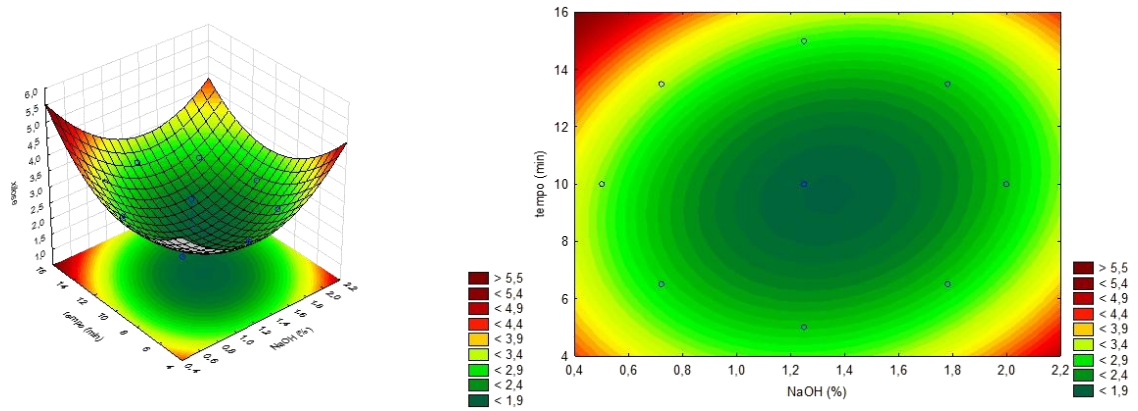
Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 16. } Z = 7,62 - 4,13X + 1,83X^2 - 0,61Y + 0,37Y^2 - 0,08XY \quad (16)$$

O gráfico de superfície de resposta e o gráfico de contorno (Gráfico 22) mostram que a utilização de concentrações médias de NaOH e tempos médios de reação não favorecem a liberação de xilose. O aumento excessivo do reagente também pode levar a uma destruição do açúcar, a menos que se utilize um tempo mais curto de reação.

Seguindo a tendência para aumentar a liberação de xilose, a faixa de tratamento ideal prevê a utilização de baixas concentrações de NaOH por um período de tempo maior.

Gráfico 22 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta xilose em função da concentração de NaOH e tempo de tratamento



Fonte: Dados do autor

Analisando os dados obtidos, foi selecionada a condição de 0,72% de NaOH por 13,5 minutos, para sequência do trabalho.

5.5 Parte 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para hidrólise ácida em autoclave

5.5.1 Variável resposta açúcares redutores (AR) (Parte 5)

Para a variável resposta açúcares redutores (AR), a interação e todos os fatores, exceto o fator quadrático tempo, exerceram efeito negativo (Tabela 43).

Tabela 43 - Efeitos e interações calculadas para a variável açúcares redutores (AR) (Parte 5)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	8,226610	0,519964	15,82151
Concentração H ₂ SO ₄ % (Linear)	-0,515101	0,633685	-0,81287
Concentração H ₂ SO ₄ % (Quadrática)	-0,089874	0,747686	-0,12020
Tempo em minutos (Linear)	-0,072404	0,633685	-0,11426
Tempo em minutos (Quadrática)	0,629936	0,747686	0,84252
Concentração H ₂ SO ₄ x Tempo	-0,925000	0,900726	-1,02695

Fonte: Dados do autor

Os resultados da análise de variância (ANOVA) na Tabela 44 indicam que os fatores e interação não influenciaram significativamente na variável resposta, ou seja, a liberação dos açúcares não sofre influência desses fatores. Além disso, o valor R² foi baixo (0,34155), indicando que apenas 34% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 17).

Tabela 44 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta açúcares redutores (AR) (Parte 5)

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,536073	1	0,536073	0,660752	0,453245
X ²	0,011722	1	0,011722	0,014449	0,909004
Y	0,010592	1	0,010592	0,013055	0,913479
Y ²	0,575892	1	0,575892	0,709832	0,437932
X.Y	0,855625	1	0,855625	1,054625	0,351536
Erro	4,056536	5	0,811307		
Total	6,160732	10			

R²0,34155; R²ajustado0

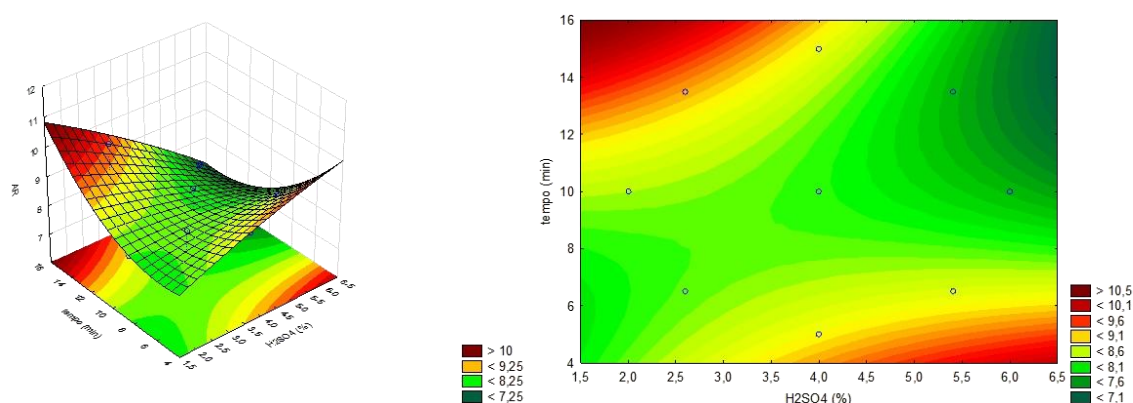
Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 17. } Z = 7,50 + 0,94X - 0,02X^2 - 0,15Y + 0,26Y^2 - 0,09XY \quad (17)$$

Mesmo diante dos dados apresentados foi gerada a superfície de resposta e um gráfico de contorno (Gráfico 23) para verificar a tendência de respostas deste processo, no

qual é possível verificar que os fatores se comportam de maneira inversamente proporcional ao aumento da variável resposta AR.

Gráfico 23 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta açúcar redutor em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento



Fonte: Dados do autor

5.5.2 Variável resposta glicose (Parte 5)

Na variável resposta glicose, a interação dos fatores mostrou efeito negativo, assim como o coeficiente quadrático da concentração de ácido sulfúrico (Tabela 45).

Tabela 45 - Efeitos e interações calculadas para a variável glicose (Parte 5)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	2,905529	0,202495	14,34863
Concentração H_2SO_4 % (Linear)	0,326313	0,246783	1,32227
Concentração H_2SO_4 % (Quadrática)	-0,134839	0,291179	-0,46308
Tempo em minutos (Linear)	0,089444	0,246783	0,36244
Tempo em minutos (Quadrática)	0,235111	0,291179	0,80744
Concentração H_2SO_4 x Tempo	-0,320000	0,350780	-0,91225

Fonte: Dados do autor

A Tabela da ANOVA (Tabela 46) mostra que os fatores e interação não tiveram influência significativa na variável glicose neste planejamento, a um intervalo de confiança de 95%. Esta variável teve apenas 43% das respostas explicadas pelo modelo (Equação 18), de acordo com o coeficiente de determinação.

Tabela 46 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta glicose (Parte 5)

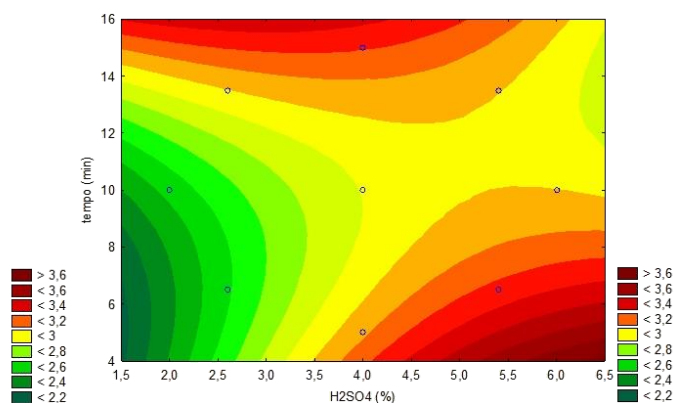
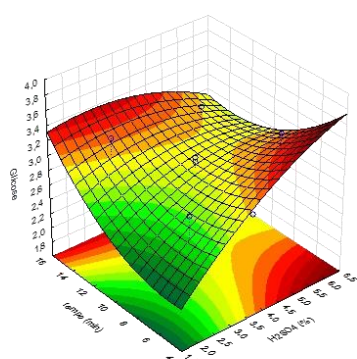
	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	0,215134	1	0,215134	1,748394	0,243334
X ²	0,026386	1	0,026386	0,214441	0,662765
Y	0,016164	1	0,016164	0,131364	0,731838
Y ²	0,080222	1	0,080222	0,651966	0,456089
X.Y	0,102400	1	0,102400	0,832206	0,403476
Erro	0,615232	5	0,123046		
Total	1,097035	10			

R²0,43919; R²ajustado0

Fonte: Dados do autor

Equação 18. $Z = 1,41 + 0,71X - 0,03X^2 - 0,05Y + 0,01Y^2 - 0,03XY$ (18)

A superfície de resposta e gráfico de contorno (Gráfico 24) indicam que tanto concentrações baixas e médias de ácido (<4%) por um período de reação maior (15 minutos), quanto maiores concentrações de ácido (5,5 ou 6,5%) por um tempo curto (4 minutos), favorecem a liberação de glicose.

Gráfico 24 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta glicose em função da concentração de H₂SO₄ e tempo de tratamento

Fonte: Dados do autor

5.5.3 Variável resposta xilose (Parte 5)

Para xilose, os coeficientes lineares de concentração de ácido e tempo de reação, além da interação, mostraram efeito negativo sobre o processo (Tabela 47).

Tabela 47 - Efeitos e interações calculadas para a variável xilose (Parte 5)

	Efeito	Erro Puro	t(5)
Média	5,160164	0,346453	14,89428
Concentração H ₂ SO ₄ % (Linear)	-0,814970	0,422225	-1,93018
Concentração H ₂ SO ₄ % (Quadrática)	0,012863	0,498184	0,02582
Tempo em minutos (Linear)	-0,182848	0,422225	-0,43306
Tempo em minutos (Quadrática)	0,423483	0,498184	0,85005
Concentração H ₂ SO ₄ x Tempo	-0,566000	0,600155	-0,94309

Fonte: Dados do autor

Tabela 48 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta xilose (Parte 5)

	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor
X	1,341906	1	1,341906	3,725588	0,111465
X ²	0,000240	1	0,000240	0,000667	0,980400
Y	0,067549	1	0,067549	0,187540	0,683016
Y ²	0,260267	1	0,260267	0,722590	0,434102
X.Y	0,320356	1	0,320356	0,889418	0,388937
Erro	1,800931	5	0,360186		
Total	3,812327	10			

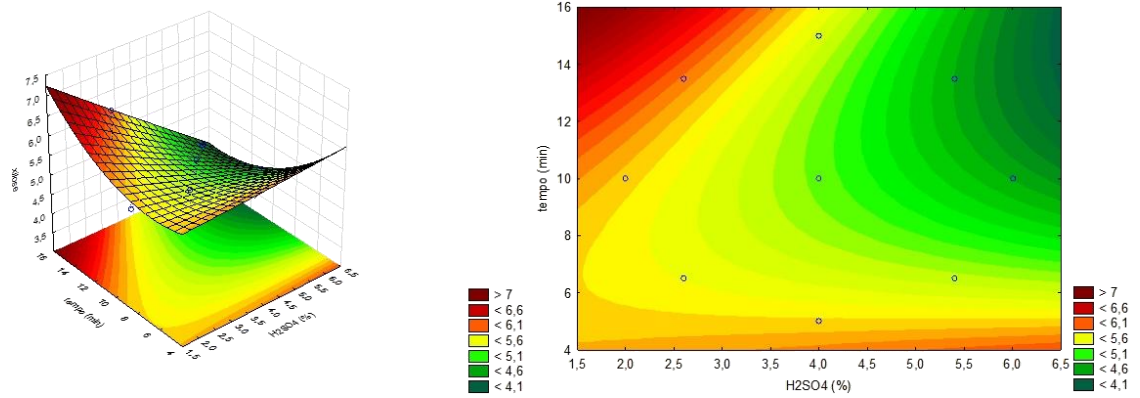
R²0,5276; R²ajustado 0,05521

Fonte: Dados do autor

$$\text{Equação 19. } Z = 6,06 + 0,26X + 0,01X^2 - 0,14Y + 0,17Y^2 - 0,06XY \quad (19)$$

A análise de variância (Tabela 48) não mostrou influência significativa dos fatores nem da interação em relação a variável resposta e apenas 52% das respostas podem ser explicadas pelo modelo (Equação 19). Entretanto pela superfície de resposta e pelo gráfico de contorno (Gráfico 25) é possível observar que menores concentrações de ácido utilizando um tempo mais longo de reação podem favorecer a liberação de xilose. Na literatura são apontados que o aumento da concentração dos reagentes, principalmente, os ácidos que atacam as cadeias de hemicelulose, também pode provocar destruição dos açúcares ou transformação destes em compostos inibitórios da fermentação (LASER et al., 2002; CARRION; DORTA, 2009).

Gráfico 25 - Superfície de resposta e gráfico de contorno para avaliação da resposta xilose em função da concentração de H_2SO_4 e tempo de tratamento



Fonte: Dados do autor

Diante dos resultados obtidos nesta parte do experimento optou-se pela utilização de 2,6% de H_2SO_4 por 13,5 minutos de reação para o processo de hidrólise ácida nas próximas etapas do experimento.

5.6 Parte 6 – Fermentação de mostos sintéticos contendo glicose e xilose

5.6.1 Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura *Pichia stipitis* CCT 2617

A Tabela 49 e o Gráfico 26 mostram os resultados da cinética da fermentação do mosto sintético de açúcares pela levedura *Pichia stipitis* CCT 2617.

A máxima produção de biomassa foi alcançada em 36 horas de fermentação com $4,24 \text{ g L}^{-1}$, entretanto a conversão máxima de substrato a célula foi no período de 0 para 6 horas de fermentação ($Y_{x/s}$ $0,34 \text{ g g}^{-1}$) assim como a melhor produtividade celular (P_x $0,14 \text{ g L.h}^{-1}$).

A melhor produção de etanol ocorreu às 30 horas de fermentação ($1,53 \text{ g L}^{-1}$), porém a melhor conversão substrato/produto ($Y_{e/s}$) foi em 24 horas de fermentação com $0,10 \text{ g g}^{-1}$, bem como a melhor produtividade etanólica (P_e $0,06 \text{ g L.h}^{-1}$) e rendimento etanólico (η 20,10 %).

Tabela 49 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pela levedura *Pichia stipitis* CCT 2617 durante as 48 horas de fermentação

Tempo (horas)	Biomassa (g L^{-1}) ^a	Açúcar (g L^{-1}) ^b	Etanol (g L^{-1}) ^c	P_x (g L.h^{-1}) ^d	$Y_{x/s}$ (g g^{-1}) ^e	$Y_{e/s}$ (g g^{-1}) ^f	P_e (g L.h^{-1}) ^g	η (%) ^h
0	0,47	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	1,29	17,60	0,13	0,14	0,34	0,05	0,02	10,60
12	2,02	12,60	0,20	0,13	0,21	0,03	0,02	5,30
18	2,37	8,50	0,60	0,11	0,17	0,05	0,03	10,22
24	3,22	5,40	1,50	0,11	0,19	0,10	0,06	20,10
30	3,78	3,33	1,53	0,11	0,20	0,09	0,05	17,95
36	4,24	3,11	0,86	0,10	0,22	0,05	0,02	9,96
42	4,06	3,37	0,83	0,09	0,22	0,05	0,02	9,77
48	4,37	2,61	0,90	0,08	0,22	0,05	0,02	10,13

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L^{-1})

^b Consumo de açúcar: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L^{-1})

^c Produção de etanol: concentração máxima de etanol obtido ao longo da fermentação (g L^{-1})

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h^{-1})

^e Conversão substrato em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g^{-1})

^f Conversão substrato em etanol obtido ao longo da fermentação (g g^{-1})

^g Produtividade em etanol obtido ao longo da fermentação (g L.h^{-1})

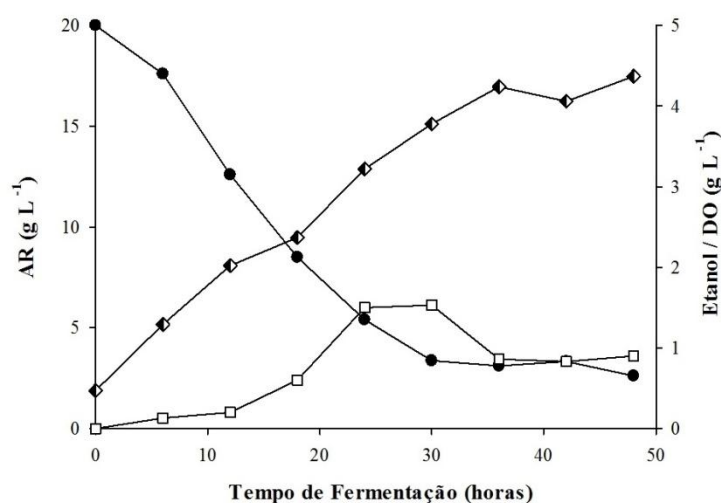
^h Rendimento etanólico ao longo da fermentação referente ao fator estequiométrico de conversão de glicose/xilose em etanol (%)

Fonte: Dados do autor

Agbogbo et al. (2006) estudaram a fermentação de glicose/xilose por *Pichia stipitis* CBS 6054 e obtiveram $23,4 \text{ g L}^{-1}$ de etanol, com conversão de substrato a produto $Y_{e/s}$ de $0,44 \text{ g g}^{-1}$ e P_e $0,19 \text{ g L.h}^{-1}$, entretanto o tempo de fermentação (120 h) foi superior ao atual

trabalho. Hickert (2010) estudou a fermentação de *Pichia stipitis* IMH 43.2 e observou que o crescimento máximo foi com 108 horas de fermentação chegando a $4,1 \text{ g L}^{-1}$ e com P_x de $0,25 \text{ g L.h}^{-1}$, com relação a produção de etanol a máxima conversão foi $0,36 \text{ g g}^{-1}$, mais uma vez o tempo empregado foi superior ao atual trabalho.

Gráfico 26 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pela levedura *Pichia stipitis* CCT 2617 durante as 48 horas de fermentação



Legenda: —●— AR —□— ETANOL —◇— BIOMASSA

Fonte: Dados do autor

5.6.2 Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae*

Na análise dos parâmetros cinéticos (Tabela 50) e fermentativos (Gráfico 27) do consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae*, é possível notar que a maior produção de biomassa ocorreu em 42 horas de fermentação. Porém a maior produtividade celular (P_x $0,28 \text{ g L.h}^{-1}$) e a conversão de substrato a célula ($Y_{x/s}$ $0,35 \text{ g g}^{-1}$) foi observada em 6 horas de fermentação.

Com relação à produção de etanol, o máximo foi $3,57 \text{ g L}^{-1}$ em 30 horas de fermentação, entretanto ao avaliar outros parâmetros como a produtividade, a melhor foi em 18 horas com P_e $0,18 \text{ g L.h}^{-1}$, assim como para conversão de substrato a etanol $Y_{e/s}$ $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e rendimento η 77,12%.

Tabela 50 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* durante as 48 horas de fermentação

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Açúcar (g L ⁻¹) ^b	Etanol (g L ⁻¹) ^c	P _x (g L.h ⁻¹) ^d	Y _{x/s} (g g ⁻¹) ^e	Y _{e/s} (g g ⁻¹) ^f	P _e (g L.h ⁻¹) ^g	η (%) ^h
0	0,98	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	2,64	15,33	0,41	0,28	0,35	0,09	0,07	17,22
12	2,84	12,81	1,15	0,16	0,26	0,16	0,10	31,33
18	2,8	11,95	3,17	0,10	0,22	0,39	0,18	77,12
24	3,05	10,64	3,56	0,09	0,22	0,38	0,15	74,47
30	3,23	8,47	3,57	0,08	0,19	0,31	0,12	60,61
36	3,52	7,39	3,21	0,07	0,20	0,25	0,09	49,84
42	4,26	7,42	3,01	0,08	0,26	0,24	0,07	46,88
48	2,27	6,15	3,05	0,03	0,09	0,22	0,06	43,14

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de açúcar: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Produção de etanol: concentração máxima de etanol obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^e Conversão substrato em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^f Conversão substrato em etanol obtido ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^g Produtividade em etanol obtido ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

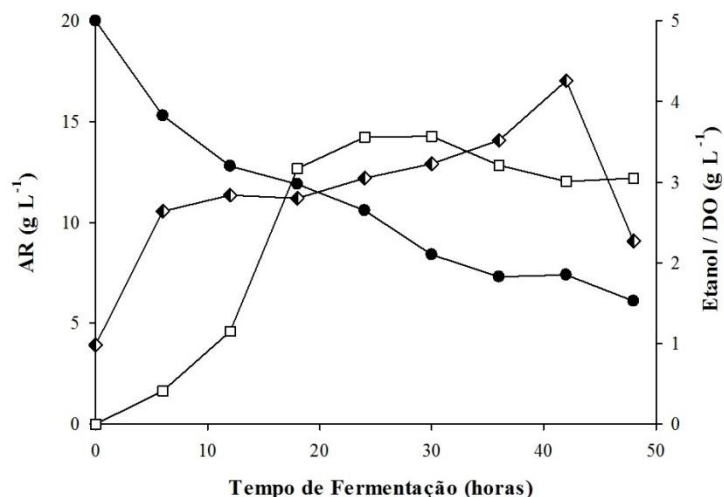
^h Rendimento etanólico ao longo da fermentação referente ao fator estequiométrico de conversão de glicose/xilose em etanol (%)

Fonte: Dados do autor

Cassales (2010) estudou o comportamento de várias leveduras (gêneros *Candida*, *Saccharomyces*) e a bactéria *Zymomonas* em consórcio para a produção de etanol e xilitol, para posterior emprego no hidrolisado de casca de soja. O autor relata que a maior produção de etanol foi de 6,3 g L⁻¹ com Y_{e/s} de 0,08 g g⁻¹ em 60 horas de fermentação, enquanto que no presente estudo a máxima (3,57 g L⁻¹ de etanol) foi alcançada em 30 horas e com Y_{e/s} superior em 4 vezes.

Hickert (2010) estudando o consórcio de leveduras *S. cerevisiae* e *P. stipitis* encontrou Y_{e/s} 0,30 g g⁻¹ de conversão substrato em etanol e P_e 0,11 g L.h⁻¹, comparando com o atual trabalho a conversão Y_{e/s} é 8% maior e o P_e é 7% maior que os encontrados pelo autor citado. Tais resultados mostram que o emprego do consórcio de *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* é muito promissor para este tipo de processo.

Gráfico 27 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* durante as 48 horas de fermentação



Legenda: —●— AR —□— ETANOL —◆— BIOMASSA

Fonte: Dados do autor

5.6.3 Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891

Para a levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 (Tabela 51) a produção máxima de biomassa ($3,49 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu em 48 horas de fermentação, a produtividade celular (P_x $0,06 \text{ g L.h}^{-1}$) em 18 horas assim como a conversão de substrato a célula ($Y_{x/s}$ $0,18 \text{ g g}^{-1}$).

A produção de etanol foi inferior aos consórcios de leveduras, com apenas $1,05 \text{ g L}^{-1}$, mostrando também baixa produtividade (P_e $0,04 \text{ g L.h}^{-1}$), conversão de substrato a produto ($Y_{e/s}$ $0,16 \text{ g g}^{-1}$) e consequentemente rendimento (η 31,25%).

Tabela 51 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pela levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 durante as 48 horas de fermentação

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Açúcar (g L ⁻¹) ^b	Etanol (g L ⁻¹) ^c	P _x (g L.h ⁻¹) ^d	Y _{x/s} (g g ⁻¹) ^e	Y _{e/s} (g g ⁻¹) ^f	P _e (g L.h ⁻¹) ^g	η (%) ^h
0	0,43	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,54	17,13	0,69	0,02	0,04	0,24	0,12	6,13
12	0,78	15,85	0,65	0,03	0,08	0,15	0,05	30,66
18	1,46	13,34	0,94	0,06	0,18	0,14	0,05	27,64
24	1,61	13,42	1,05	0,05	0,15	0,16	0,04	31,25
30	1,94	11,28	1,03	0,05	0,17	0,12	0,03	23,14
36	2,66	9,67	0,83	0,06	0,21	0,08	0,02	15,74
42	2,95	9,24	0,68	0,06	0,23	0,06	0,02	12,38
48	3,49	8,98	0,71	0,06	0,28	0,06	0,01	12,61

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de açúcar: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Produção de etanol: concentração máxima de etanol obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^e Conversão substrato em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^f Conversão substrato em etanol obtido ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^g Produtividade em etanol obtido ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

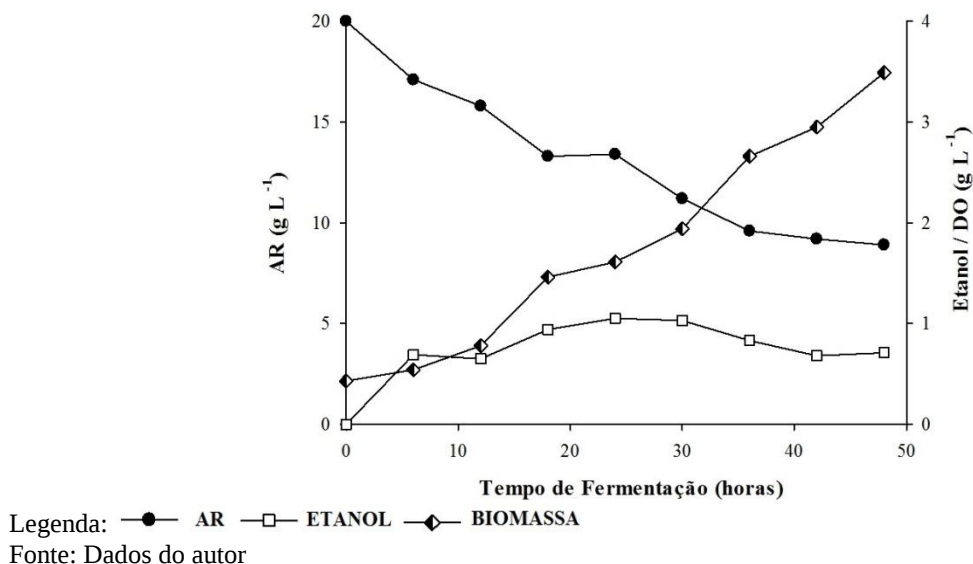
^h Rendimento etanólico ao longo da fermentação referente ao fator estequiométrico de conversão de glicose/xilose em etanol (%)

Fonte: Dados do autor

Zhao, Zhang e Tan (2008) estudaram o comportamento da levedura *Pachysolen tannophilus* 1771, em fermentação de glicose e xilose, e relatam que existe uma preferência desta levedura por glicose e que no mosto 100% glicose a produção de etanol em 12h foi de 6,9 g L⁻¹, enquanto que no mosto com xilose 100% a produção foi de 2,70 g L⁻¹ em 48 horas, o contrário aconteceu em relação à produção de biomassa. Diante do encontrado por esses autores, pode-se dizer que o baixo rendimento de etanol encontrado no atual trabalho pode ter sido provavelmente por conta da mistura de açúcares que deixou o metabolismo da levedura em conflito, já que um dos açúcares estimula o crescimento e o outro a produção de etanol.

Sánchez et al. (2003) avaliaram o comportamento da levedura *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 na fermentação de xilose a 30°C por 30 horas para produção de etanol e xilitol. A conversão máxima obtida em etanol foi Y_{e/s} 0,39 g g⁻¹ com produtividade P_e 0,06 g L.h⁻¹ e conversão máxima em biomassa Y_{x/s} 0,34 g g⁻¹. Estes resultados são superiores ao encontrado neste estudo, entretanto os autores utilizaram somente xilose como fonte de carbono, dessa forma o metabolismo da levedura foi direcionado exclusivamente para o consumo e conversão desta pentose.

Gráfico 28 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pela levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 durante às 48 horas de fermentação.



5.6.4 Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae*

No consórcio de *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 52), a biomassa chegou a 3,91 g L⁻¹ em 30 horas de fermentação e novamente a produtividade celular (P_x 0,22 g L.h⁻¹) e conversão de substrato a célula ($Y_{x/s}$ 0,48 g g⁻¹) máximos ocorreram nas primeiras 6 horas.

A produção de etanol máxima foi 2,98 g L⁻¹ em 24 horas de fermentação, valor esse superior às fermentações das leveduras sem consórcio, porém inferior ao consórcio com *Pichia stipitis*. O mesmo acontece ao analisar a produtividade etanólica (P_e 0,16g L.h⁻¹), conversão de substrato a produto ($Y_{e/s}$ 0,32 g g⁻¹) e rendimento etanólico (η 50,42 %).

Just et al. (2015) estudaram a fermentação do hidrolisado de pseudocaule de bananeira por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603 e *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 com fermentação individual e obtiveram, como resultados, que independente da espécie de micro-organismo utilizada, o emprego de 80 g L⁻¹ de AR proporcionou a obtenção de rendimento médio em etanol de $Y_{e/s}$ 0,49 g g⁻¹ em 24 horas de fermentação, entretanto o açúcar não foi totalmente consumido. Comparando estes resultados com o atual trabalho,

pode-se notar que o emprego das leveduras em conjunto na fermentação pode ocorrer e que a maior produção de etanol também acontece em 24 horas.

Tabela 52 - Parâmetros cinéticos da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* durante as 48 horas de fermentação

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Açúcar (g L ⁻¹) ^b	Etanol (g L ⁻¹) ^c	P _x (g L.h ⁻¹) ^d	Y _{x/s} (g g ⁻¹) ^e	Y _{e/s} (g g ⁻¹) ^f	P _e (g L.h ⁻¹) ^g	η (%) ^h
0	0,59	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	1,88	17,32	0,37	0,22	0,48	0,14	0,06	27,20
12	1,76	13,94	1,95	0,10	0,19	0,32	0,16	63,10
18	2,79	10,25	2,93	0,12	0,22	0,30	0,16	58,83
24	3,24	8,43	2,98	0,11	0,23	0,26	0,12	50,42
30	3,91	6,57	2,77	0,11	0,25	0,21	0,09	40,37
36	3,57	6,61	2,86	0,08	0,22	0,21	0,08	41,81
42	3,29	5,84	2,68	0,06	0,19	0,19	0,06	37,06
48	3,12	4,74	2,69	0,06	0,16	0,18	0,06	34,53

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de açúcar: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Produção de etanol: concentração máxima de etanol obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^e Conversão substrato em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

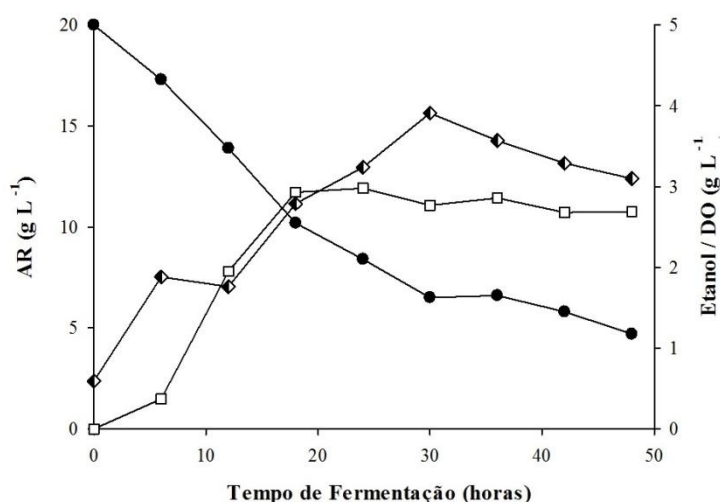
^f Conversão substrato em etanol obtido ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^g Produtividade em etanol obtido ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^h Rendimento etanólico ao longo da fermentação referente ao fator estequiométrico de conversão de glicose/xilose em etanol (%)

Fonte: Dados do autor

Gráfico 29 - Parâmetros da fermentação do mosto sintético pelo consórcio das leveduras *Pachysolen tannophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* durante as 48 horas de fermentação



Legenda: —●— AR —□— ETANOL —◆— BIOMASSA

Fonte: Dados do autor

O consórcio formado pelas leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* foi o que apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros, mostrando um bom potencial para aplicação neste tipo de fermentação que envolve vários açúcares. De acordo com os dados obtidos, para a próxima etapa, o tempo de fermentação foi reduzido para 24 horas, levando em consideração os dados da cinética de fermentação das leveduras.

5.7 Parte 7 – Parâmetros cinéticos e fermentativos de leveduras em mostos de hidrolisado de casca de uva

Os dados das cinéticas e parâmetros fermentativos das leveduras e consórcios são apresentados nas Tabelas 53, 54, 55 e 56 e Gráficos 30, 31, 32 e 33.

5.7.1 Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura *Pichia stipitis* CCT 2617

Para a levedura *Pichia stipitis* CCT 2617, a maior concentração de biomassa foi 2,64 g L⁻¹ em 15 horas de fermentação (Tabela 53). A produtividade máxima (P_x 0,12 g L.h⁻¹) ocorreu em 12 horas de fermentação.

Com relação ao consumo e conversão de açúcares a células, para ambos (glicose e xilose), a máxima foi em 12 horas de fermentação, com $Y_{x/s}$ 1,33g de glicose g⁻¹ de células e $y_{x/s}$ 0,97 g de xilose g⁻¹ de células.

Tabela 53 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado por *Pichia stipitis* CCT 2617 durante 24 horas.

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Glicose (g L ⁻¹) ^b	Xilose (g L ⁻¹) ^c	P_x (g L.h ⁻¹) ^d	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹) ^e	$y_{x/s}$ (g g ⁻¹) ^f
0	1,33	1,8	7,6	0,00	0,00	0,00
3	1,28	1,44	7,13	-0,02	-0,14	-0,11
6	0,2	1,38	7,24	-0,19	-2,69	-3,14
9	1,37	0,98	6,77	0,00	0,05	0,05
12	2,71	0,76	6,18	0,12	1,33	0,97
15	2,64	0,54	6,22	0,09	1,04	0,95
18	2,56	0,32	5,59	0,07	0,83	0,61
21	2,54	0,29	4,31	0,06	0,80	0,37
24	1,05	0,21	3,68	-0,01	-0,18	-0,07

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de glicose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Consumo de xilose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^e Conversão de glicose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^f Conversão de xilose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

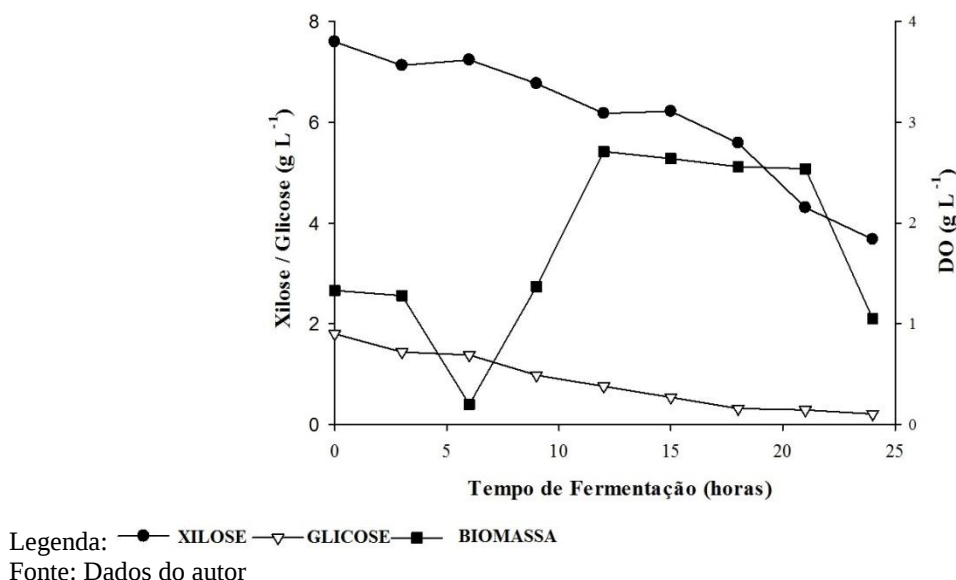
Fonte: Dados do autor

De acordo com a Tabela 53, é possível notar que a glicose é consumida quase que totalmente, enquanto que a xilose ainda sobra ao final do processo, entretanto a quantidade de glicose gerada no hidrolisado é 4 vezes menor que a xilose.

Nigam (2001) estudando *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 geneticamente modificada para tolerar compostos inibidores do hidrolisado, obteve como resultado $Y_{x/s}$ 0,08

g g^{-1} de conversão de substrato a célula e P_x $0,04 \text{ g L}^{-1}$. Levando-se em consideração que o meio hidrolisado deste autor foi suplementado com sais e açúcar, os resultados obtidos no atual trabalho demonstram que a levedura *Pichia stipitis* CCT 2617 apresentou uma queda na produção de biomassa e, conseqüentemente, na produtividade celular. Este fato pode ter ocorrido pela falta de suplementação de sais no hidrolisado, ou seja, foi um fator de estresse para a levedura, entretanto após 6 horas de fermentação a levedura mostra adaptação ao meio (Gráfico 30) e, conseqüentemente, consegue utilizá-lo como promotor de crescimento, através do consumo dos açúcares presentes no hidrolisado.

Gráfico 30 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado por *Pichia stipitis* CCT 2617 durante 24 horas



5.7.2 Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae*

Ao analisar os parâmetros cinéticos do consórcio de leveduras, a máxima produção de biomassa foi alcançada em 15 horas de fermentação com $3,77 \text{ g L}^{-1}$ (Gráfico 31), assim como a conversão de glicose e xilose à células com $1,25 \text{ g g}^{-1}$ e $0,43 \text{ g g}^{-1}$ respectivamente (Tabela 54).

Comparando os dados obtidos nesta etapa do estudo com a fermentação em mosto sintético (etapa anterior), observa-se que leva um tempo maior para as leveduras se adaptarem ao meio e utilizarem os açúcares disponíveis, sem levar em consideração que a

concentração de açúcares no hidrolisado é menor, o que pode ser justificado pela falta de nutrientes no mosto. Cannetieri et al. (2002) estudaram a produção de xilitol a partir de hidrolisado de cavacos de eucalipto e verificaram que a falta de suplementação do meio, principalmente, sulfato de amônio por ser fonte de nitrogênio, prejudica o crescimento das leveduras.

Tabela 54 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617e *Saccharomyces cerevisiae* durante 24 horas.

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Glicose (g L ⁻¹) ^b	Xilose (g L ⁻¹) ^c	P _x (g L.h ⁻¹) ^d	Y _{x/s} (g g ⁻¹) ^e	y _{x/s} (g g ⁻¹) ^f
0	1,79	1,80	7,60	0,00	0,00	0,00
3	1,78	1,27	6,89	0,00	-0,02	-0,01
6	1,25	1,09	6,02	-0,09	-0,76	-0,34
9	2,08	0,65	5,34	0,03	0,25	0,13
12	3,38	0,36	3,46	0,13	1,10	0,38
15	3,77	0,21	2,96	0,13	1,25	0,43
18	3,21	0,17	2,04	0,08	0,87	0,26
21	2,67	0,00	1,82	0,04	0,49	0,15
24	1,92	0,00	1,63	0,01	0,07	0,02

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de glicose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Consumo de xilose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

^e Conversão de glicose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

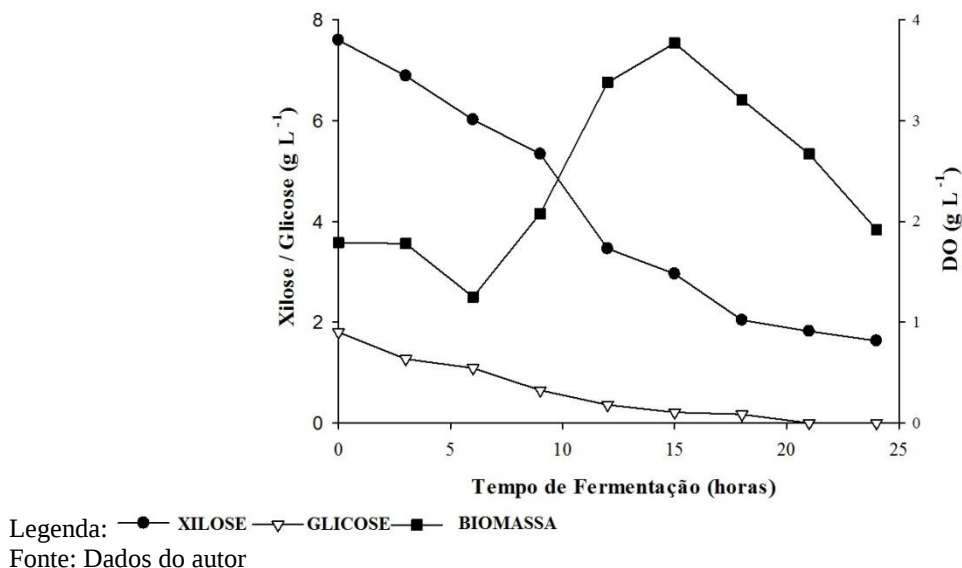
^f Conversão de xilose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

Fonte: Dados do autor

As leveduras utilizadas neste consórcio consumiram 100% da glicose em 21 horas de fermentação (Gráfico 31). Este resultado já era esperado pois a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais apto para este tipo de substrato e na concentração inicial baixa em que ele se encontrava, provavelmente, ela foi responsável pela maior parte do consumo.

Com relação a xilose, ao final do processo ainda restou 1,63 g L⁻¹. Este fato pode ocorrer visto que a levedura *Pichia stipitis* CCT 2617, provavelmente, tentou direcionar o seu metabolismo para o consumo de glicose, já que o metabolismo da xilose é mais lento (SÁNCHEZ et al., 2002), ainda assim ela metabolizou 78% da pentose.

Gráfico 31 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* durante 24 horas.



5.6.3 Parâmetros cinéticos e fermentativos da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891

Em relação à produção de biomassa a levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 teve seu máximo em 18 horas de fermentação com 2,21 g L⁻¹ (Gráfico 32). Porém a melhor produtividade celular ocorreu em 12 horas de fermentação (P_x 0,12 g L.h⁻¹), assim como as maiores conversões de glicose ($Y_{x/s}$ 0,72 g g⁻¹) e xilose ($y_{x/s}$ 0,23 g g⁻¹) em células de acordo com a Tabela 55.

Silva, Oliveira Jr e Abud (2014) estudaram a influência dos inibidores na fermentação (normalmente presentes no hidrolisado) *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 e constataram que a levedura pode ser inibida na presença de ácido acético e furfural, entretanto o meio utilizado por estes autores foi sintético com adição de nutrientes. Comparando os dados com o presente estudo, levando em consideração que o meio foi detoxicado, a falta de nutrientes pode ter sido um fator relevante no início da fermentação, porém a levedura conseguiu metabolizar os açúcares e aumentou sua biomassa no momento posterior.

Tabela 55 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pela levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 durante 24 horas.

Tempo (horas)	Biomassa (g L^{-1}) ^a	Glicose (g L^{-1}) ^b	Xilose (g L^{-1}) ^c	P_x (g L.h^{-1}) ^d	$Y_{x/s}$ (g g^{-1}) ^e	$y_{x/s}$ (g g^{-1}) ^f
0	1,62	1,80	7,60	0,00	0,00	0,00
3	1,58	1,63	7,54	-0,01	-0,24	-0,67
6	0,27	1,68	7,37	-0,23	-11,25	-5,87
9	1,13	1,54	6,93	-0,05	-1,88	-0,73
12	2,10	1,13	5,48	0,04	0,72	0,23
15	2,08	0,76	5,57	0,03	0,44	0,23
18	2,21	0,52	4,97	0,03	0,46	0,22
21	2,03	0,33	4,33	0,02	0,28	0,13
24	1,02	0,24	4,15	-0,03	-0,38	-0,17

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L^{-1})

^b Consumo de glicose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L^{-1})

^c Consumo de xilose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L^{-1})

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h^{-1})

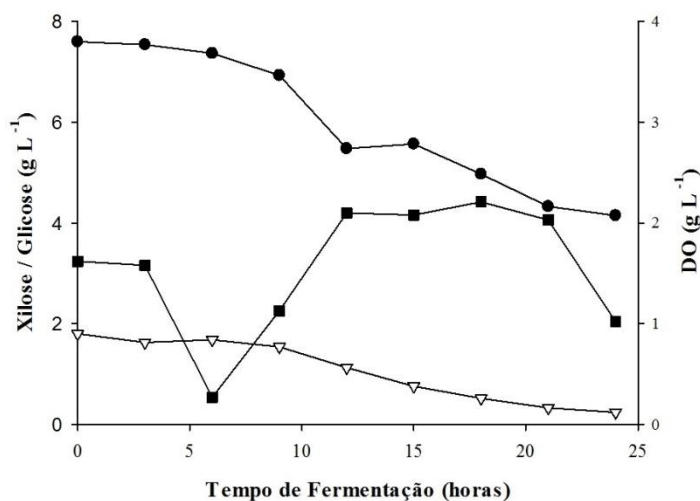
^e Conversão de glicose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g^{-1})

^f Conversão de xilose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g^{-1})

Fonte: Dados do autor

A levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 consumiu 86,66% da glicose e 79,25% da xilose disponível (Gráfico 32). Alguns autores mostram que esta levedura em presença de glicose e xilose tende a consumir a glicose primeiro, e somente quando este açúcar acaba o micro-organismo passa a consumir a xilose (ZHAO; ZHANG; TAN, 2008). No atual estudo como a quantidade de glicose era baixa, a levedura precisou utilizar os dois açúcares para promover seu crescimento.

Gráfico 32 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pela levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 durante 24 horas.



Legenda: —●— XILOSE —▽— GLICOSE —■— BIOMASSA

Fonte: Dados do autor

5.6.4 Parâmetros cinéticos e fermentativos do consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae*

A maior produtividade celular para o consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* foi alcançada em 15 horas de fermentação com P_x 0,08 g L⁻¹ (Tabela 56), assim como as maiores conversões de substratos (glicose e xilose) à células com 0,92 g g⁻¹ e 0,29 g g⁻¹, respectivamente. Já com relação à produção de biomassa, o valor máximo encontrado foi 2,34 g L⁻¹ em 18 horas de fermentação.

Tabela 56 - Parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* durante 24 horas.

Tempo (horas)	Biomassa (g L ⁻¹) ^a	Glicose (g L ⁻¹) ^b	Xilose (g L ⁻¹) ^c	P_x (g L.h ⁻¹) ^d	$Y_{x/s}$ (gg ⁻¹) ^e	$Y_{x/s}$ (gg ⁻¹) ^f
0	1,16	1,80	7,60	0,00	0,00	0,00
3	1,08	1,45	7,24	-0,03	-0,23	-0,22
6	0,58	1,26	6,96	-0,10	-1,07	-0,91
9	1,14	0,87	5,41	0,00	-0,02	-0,01
12	1,93	0,65	4,03	0,06	0,67	0,22
15	2,29	0,57	3,65	0,08	0,92	0,29
18	2,34	0,34	3,07	0,07	0,81	0,26
21	2,02	0,16	2,46	0,04	0,52	0,17
24	1,48	0,00	2,10	0,01	0,18	0,06

^a Produção de biomassa: concentração máxima de biomassa obtida ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^b Consumo de glicose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^c Consumo de xilose: concentração de açúcar obtido ao longo da fermentação (g L⁻¹)

^d Produtividade em biomassa obtida ao longo da fermentação (g L.h⁻¹)

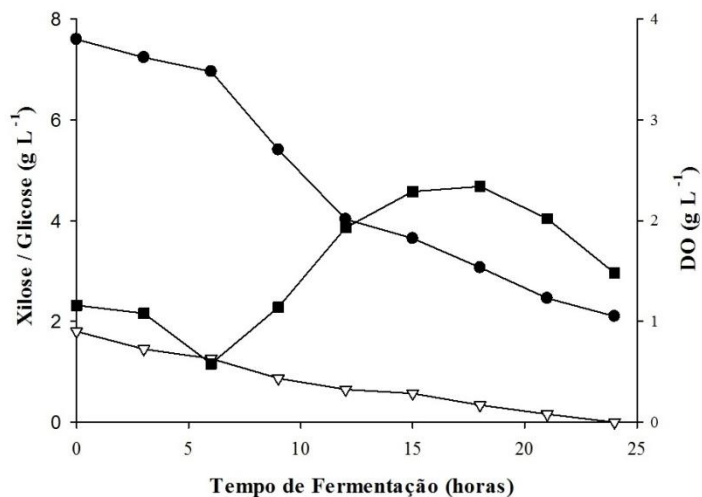
^e Conversão de glicose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

^f Conversão de xilose em biomassa obtida ao longo da fermentação (g g⁻¹)

Fonte: Dados do autor

O consórcio formado por *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* consumiu 100% da glicose em 24 horas de fermentação, com relação à xilose apenas 10,5% não foi consumida no processo (Gráfico 33). Comparando com o estudo anterior (parte 6) observa-se que, assim como ocorreu para todas as outras fermentações, as leveduras levam um tempo para se adaptarem ao mosto do hidrolisado e passam a produzir biomassa em um segundo momento da fermentação (após 9 horas).

Gráfico 33 - Parâmetros da fermentação do hidrolisado pelo consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae* durante 24 horas.



Legenda: —●— XILOSE —▽— GLICOSE —■— BIOMASSA

Fonte: Dados do autor

O consórcio utilizando *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* mostrou melhor aptidão ao consumo de açúcares provenientes do hidrolisado de casca de uva quando comparado com os outros testes envolvendo micro-organismos em cultivo individual ou o consórcio de *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Saccharomyces cerevisiae*.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A casca de uva Cabernet Sauvignon mostrou potencial como fonte lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis quando comparada ao bagaço de cana-de-açúcar.
- ✓ Os pré-tratamentos são importantes para maior eficiência da hidrólise ácida da casca de uva, tendo destaque para o hidróxido de sódio em micro-ondas.
- ✓ O planejamento DCCR melhorou as condições de pré-tratamento em micro-ondas com solução alcalina, reduzindo a concentração de reagente utilizado para maior obtenção de açúcares após a hidrólise ácida.
- ✓ O planejamento DCCR melhorou as condições de hidrólise em autoclave com solução de ácido sulfúrico, reduzindo o tempo empregado no processo para maior obtenção de açúcares fermentescíveis.
- ✓ A associação de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram potencial para a fermentação de mostos com glicose e xilose.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estabelecer metodologias de reciclo dos reagentes utilizados no processo.
- ✓ Estudar a eficiência da hidrólise enzimática neste material.
- ✓ Verificar a possibilidade de extração dos compostos fenólicos antes da hidrólise para gerar novos produtos com valor agregado.
- ✓ Verificar a eficiência da produção etanólica pelas leveduras em aumento de escala.

8. APÊNDICE A

Figura 1. Curva padrão biomassa x DO da levedura *Pichia stipitis* CCT 2617

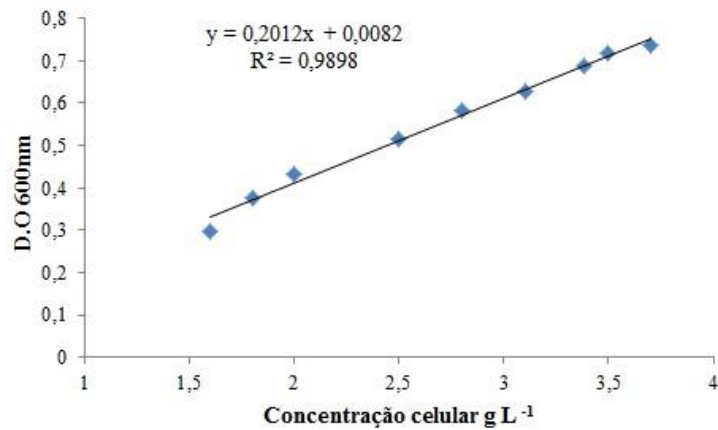


Figura 2. Curva padrão biomassa x DO do consórcio de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae*

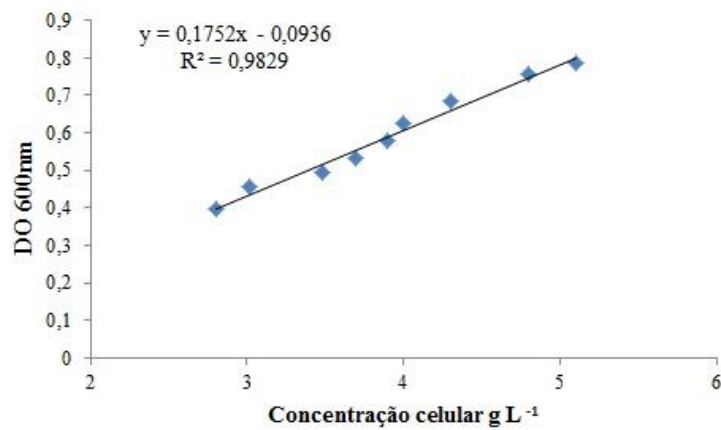


Figura 3. Curva padrão biomassa x DO da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1981

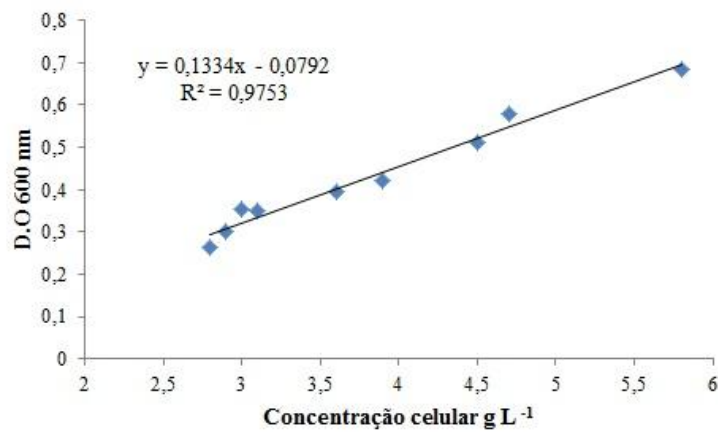


Figura 4. Curva padrão biomassa x DO do consórcio de leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1981e *Saccharomyces cerevisiae*

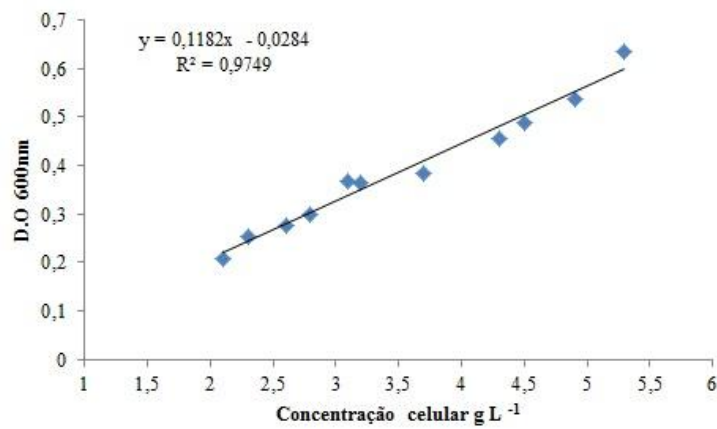


Figura 5. Curva padrão mista para açúcares redutores

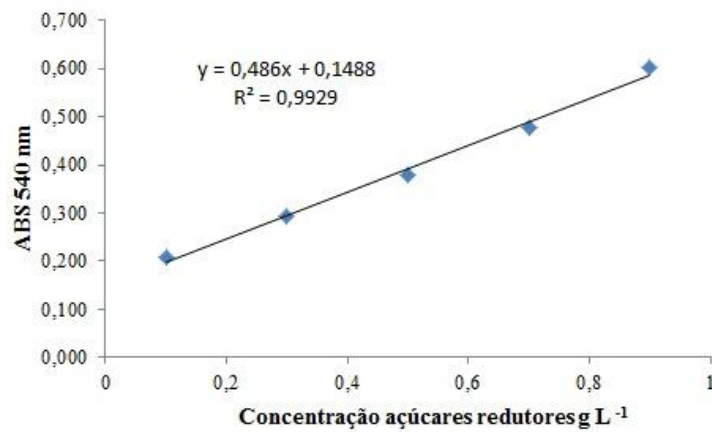


Figura 6. Curva padrão xilose

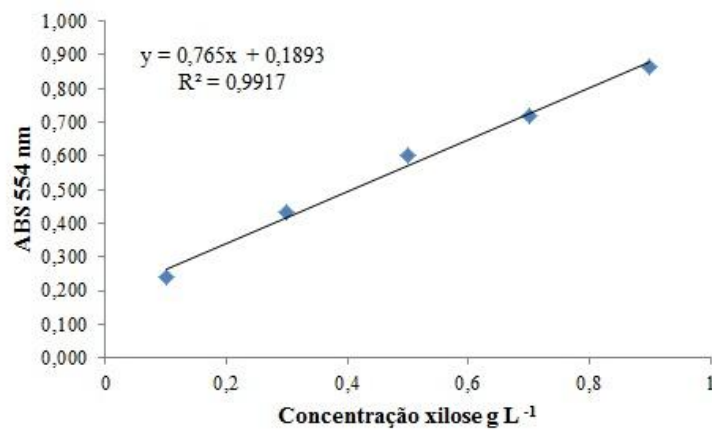
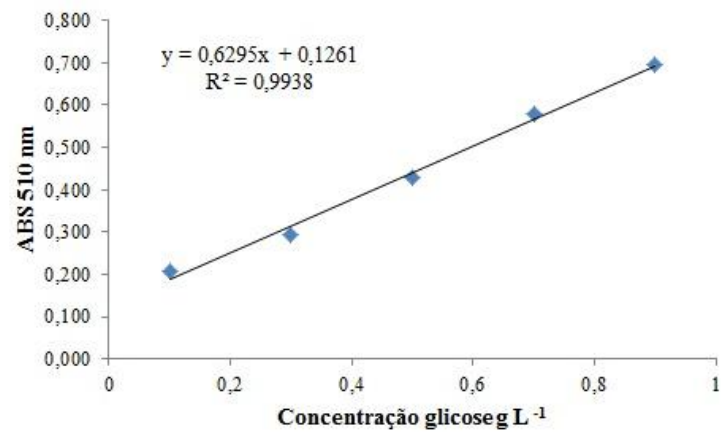


Figura 7. Curva padrão glicose



REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.*. **CiênciaTecnologia Alimentos**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **ProcessBiochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333-2336, 2006.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010, 118 folhas, Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo/PR.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALIYU, M.; HEPHER, M. J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material. **Ultrason Sonochem**, v. 7, n. 4, p. 265-8, Oct 2000.
- ALZATE, C. A. C. e TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. **Energy**, v.31, p. 2447-2459, 2006.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry International**. 13th ed. Washington. 1992. 1015 p.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 475-487, 2006.
- BAIL, S., STUEBIGER, G., KRIST, S., UNTERWEGER, H., BUCHBAUER, G. UNTERWEGER, H., BUCHBAUER, G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. **Food chemistry**, v.108, p. 1122–1132, 2008.

BARCZA, Marcos. Villela. Processos unitários orgânicos: hidrólise. Disposto em: <http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf> Acesso em 27/12/2015

BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v. 97, n. 1151, p. 142-145, 1972.

BAUDEL, H. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, 2006.

BRAVO, V; CAMACHO, F; SÁNCHEZ, S; CASTRO, E. The Effect of pH on kinetic and yield parameters during the ethanolic fermentation of D-xylose with *Pachysolen tannophilus*. **Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 159-165, 1993.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J.; FELIPE, M. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I. N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1909 –1912, 2004.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1869-1876, 2008.

CARRION, L. M.; DORTA, C. Inativação de compostos tóxicos derivados da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Analytica**(São Paulo), v.42, p.82-92, 2009.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (glycine max) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010, 138 folhas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

COSTA, D. A.; **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. 2011, 73 folhas. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

COTANA, F.; CARALAGLIO, G.; GELOSIA, M.; NICOLINI, A.; COCCIA, V. e PETROZZI, A. Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. **Energy Procedia**, v. 45, p. 42-51, 2014.

CRUZ, A. P. G.; SOUZA, C. G. S.; TORRES, A. G.; FREITAS, S. P. E CABRAL, L. M. C. Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p. 1147-1157, 2013.

CUZENS, J. C.; MILLER, J. R. AcidHydrolysisof bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 10, p. 285-290, 1997.

DA SILVA, A. S.; **Pré-tratamentos por moagem do bagaço e da palha de cana-de-açúcar para hidrólise enzimática e produção de bioetanol**. 2010, 66 folhas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DA SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009, 116 folhas. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.

DE LA ROZ, A.; DIAZ-ORTIZ, A. e MORENO, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. **Chemical Society Reviews**, n.34, p. 164-178, 2005.

DE VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource technology**, v. 135, p. 46-52, 2013.

DELLWEG, H.; RIZZI, M.; METHNER, H.; DEBUS, D. Xylose fermentation by yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 395-400, 1984.

DETONI, A. M.; CLEMENTE, E. e FORNARI, C. Produtividade e qualidade da uva ‘Cabernet Sauvignon’ produzida sob cobertura de plástico em cultivo orgânico. **Revista Brasileira Fruticultura**, vol. 29 n.3, 2007.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.22, p.177–182, 2006.

DOS SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.27-33, 2009.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 228–233, 1986.

EBERTS, T. J.; SAMPLE, R. H.; GLICK, M. R.; ELLIS, G. H. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. **Clinical Chemistry**, v. 25, p. 1440-1443, 1979.

EGÜÉS, I.; SERRANO, L.; AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; SPIGNO, G.; LABIDI, J. Fermentable sugars recovery from grape stalks for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 60, p. 553-558, 12// 2013.

ESFAHANI, M. R.; AZIN, M. Pretreatment of sugarcane bagasse by ultrasound energy and dilute acid. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 274-278, 2012.

FELIPE, M.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.; SILVA, S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 251-254, 1997.

FERREIRA, E. A.; POLACHINI, F. C.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A. V. Construção de uma célula-autoclave para medidas eletroquímicas a altas temperaturas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1647-1650, 2011.

GÁMEZ, S.; CABRIALES, J. J. G.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of food engineering**, v.74, p. 78–99, 2006.

GIOVANNINI, E.; MIELE, A.; FRÁGUAS, J. C. e BARRADAS, C. I. N. Extração de nutrientes pela videira cv. Cabernet Sauvignon na serra gaúcha. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, p. 27-40, 2001.

GOMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação da Hemicelulose do Bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985, 137 folhas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola de Campinas.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010, 315 folhas. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

HAINLINE JR, A.; THIERS, R. E. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 493-501, 1981.

HASUNUMA, T.; OKAZUKI, F.; OKAI, N.; HARA, K. Y.; ISHII, J. e KONDO, A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513-522, 2013.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S.; RAMÍREZ J.A. e VÁZQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal Cereal Science**, p.267-74, 2003.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. 2010, 117 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; BAKER, J. O.; ELANDER, R.; McMILLAN, J.D. e NIEVES, R.A. Advanced bioethanol production technologies: a perspective. **Fuels Chemistry Biomass**, v. 666, p.2-45,1997.

HU, Z. N. e WEN, Z. Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p. 369-378, 2008.

IBRAVIM. Evolução da quantidade de uvas processadas pelas empresas do RS

(milhões de kg). <http://www.ibravin.org.br/downloads/1426615110.pdf>, 2015. Acesso em: 27/12/2015.

IMAMOGLU, E. e SUKAN, F. V. The effects of single and combined cellulosic agrowaste substrates on bioethanol production. **Fuel**, v.134, p. 477-484, 2014.

JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore de conhecimento agroenergia**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009.

JOHNSON, S.L; BLISS, M.; MAYERSOHN, M.; CONRAD. K.A. Phloroglucinol-based colorimetry of xylose in plasma and urine compared with a specific gas chromatographic procedure. **Clinical Chemistry**, v.30, p.1571-1574. 1984.

JUST, L. P.; LIEBL, G. F.; MONTAGNOLI, M. S.; MARANGONI, C.; SELLIN, N.; SOUZA, O. Produção de bioetanol de pseudocaule de bananeira por diferentes espécies de micro-organismos. **IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais**. Rio de Janeiro 2015.

KESHWANI, D. R. **Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production**. 2009, Tese (Doutorado) - Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América- EUA.

KIIPPER, P. G. **Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus***. 2009. 101 folhas. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências de Rio Claro.

KLASS, L. D. Biomass for renewable energy, fuels and chemicals. San Diego, California – Academic Press, 500 p., 1998.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; STEPHEN, G. A.; LICHEA, J.; ANTAL-JR, M. J.; LYND, L. R. A. comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v 81, p. 33 – 44, 2002.

LEE, H.; SOPHER, C.R.; YAU, K.Y.F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.66, p.375- 379, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6 ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

LI, K. C.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S. e ERIKSSON, K.E.L. Relation ships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p.89-94. 2000.

LÓPEZ-LINARES, J. C.; CARA, C.; MOYA, M.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; ROMERO, I. Fermentable sugar production from rapeseed straw by dilute phosphoric acid pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 525-531, 10// 2013.

LUNELLI, F. C.; SFALCIN, P.; SOUZA, M.; ZIMMERMANN, E.; DAL PRÁ, V.; FOLETTO, E. L.; JAHN, S. L.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. **Biosystems Engineering**, v. 124, p. 24-28, 8// 2014.

MacDONALD, D. G.; BAKHSHI, N.; MATHEWS, J. F.; ROYCHOWDHURY, A.; BAJPAI, P. e MOO-YOUNG, M. Alkaline treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 25, p. 2067-2076, 1983.

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xyloseederived biochemical. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 5, p. 438-454, 2008.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJODE, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 339-352, Apr 2007.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; PESSOA Jr, A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, v. 03, p. 45-53, 2003.

MARZIALETTI, T.; OLARTE, M. B.V.; SIEVERS, C.; HOSKINS, T. J. C.; AGRAWAL, P. K. e JONES, C. W. Dilute acid hydrolysis of loblolly pine: a comprehensive approach. **I & EC Research** , v.47, p. 7131-7140, 2008.

McINTOSH, S. e VANCOR, T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6718-6727, 2010.

MENDES, J. A. S.; PROZIL, S. O.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 25-32, 2013.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 8// 2012.

MILLER, F.; CALDEIRÃO, L. ; DORTA, C.; MARINELLI, P.S. Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da casca de laranja e bagaço de cana-de-açúcar. **Analytica** (São Paulo), v. 10, p. 2, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MURARI, C. S.; MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate destoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, p. 49-58, 2002.

NIGAM, J. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichiastipitis*. **Journal of biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVA-NETO, P; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de microbiologia**, v. 28, p. 25-31, 1997.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKA, P.; GALBE, M. e ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**, v.96, p. 843-850, 2005.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 38, p. 53-87, 1989.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinustaeda* Wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v.36, n.1, p.31-39. 2005.

PEREIRA, A.; MARTINS, G.; ANTUNES, P.; CONRRADO, R.; PASQUINI, D.; JOB, A.; CURVELO, A.; FERREIRA, M.; RIUL, A.; CONSTANTINO, C. Lignin from sugar cane bagasse: Extraction, fabrication of nanostructured films, and application. **Langmuir**, v. 23, n. 12, p. 6652-6659, 2007.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Department of Biotechnology /FAENQUIL**, Lorena/SP, Brasil.1997.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 67 Folhas. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PITARELO, A. P.; DA SILVA, T. A. ; PERALTA-ZAMORA, P. G. ; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, p. 1502-1509, 2012.

POMMER, C. V.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Cultivares de videira. In: POMMER, C. V. Ed. Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 109-294, 2003.

PROZIL, S. O.; COSTA, E. V.; EVTUGUIN, D. V.; CRUZ LOPES, L. P. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. **Carbohydrate Research**, v. 356, p. 252-259, 2012a.

PROZIL, S. O.; EVTUGUIN, D. V.; CRUZ LOPES, L. P. Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. **Industrial Crops and Products**, v. 35(1), p. 178-184, 2012b.

RAHMAN, S. H. A.; CHOUDHURY, J. P.; AHMAD, A. L.; KAMARUDDIN, A. H. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresource Technology**, v.98, Issue 3, p.554-559, 2007.

READING, N. S.; WELCH, K. D.; AUST, S. D.; GOODELL, B.; NICHOLAS, D.; SCHULTZ, T. Free radical reactions of wood-degrading fungi. Current knowledge of wood deterioration mechanisms and its impact on biotechnology and wood preservation. Symposium at the 22^{1st} National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, California, USA, 1-5 April 2001., 2003. American Chemical Society.p.16-31.

REDDY, N. e YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications.**Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 22-27, 2005.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. Dilute-acidhydrolysis for optimizationofxyloserecoveryfrom rice straw in a semi-pilotreactor. **Industrial Crops and**

Products, v. 17, n. 3, p. 171-176, 2003.

ROCHA, G. L. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production.

Industrial Crops and Products, v. 35, n.1, p. 274-279, 2012.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLO, M. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosichydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v.18, n.3, 2001.

RODRIGUES, T. H. S. **Estudo do pré-tratamento alcalino em micro-ondas da fibra do caju (*Anacardium occidentale* L.) seguido de hidrólise enzimática para produção de etanol**. 2010. 71 Folhas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ROSSELL, C. E. V.; et al. Saccharification of sugarcane bassage for ethanol production using the Organosolv process. **Internacional Sugar Journal**, v.107, n.1275, p. 192-195. 2005.

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

RUDOLF, A.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAGERDAL, B. H.; LIDEN, G. Simultaneous Saccharification and Fermentations of Steam-Pretreated Bagasse Using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and Bioengineering**, v 99, p. 783 – 790, 2008.

SADDLER, J. N., RAMOS, L. P. e BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: *Bioconversion of forest and agricultural plant residues* (Saddler, J. N., Ed.). **CAB International Wallingford. UK**, p.73-91, 1993.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 12// 2005.

SÁNCHEZ, O. J. ; CARDONA, C.A.; Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270-5295, 2008.

SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; MOYA, A.; CASTRO, E.; CAMACHO, F. Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 673-679, 2004.

SÁNCHEZ, S; BRAVO, V; CASTRO, E; MOYA, A.J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 641-648, 2002.

SANTOS, J. R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SCHIRMER-MICHEL, A.C; FLORES, S.H; HERTZ, P.F; MATOS, G.S; AYUB, M.A.Z; Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898-2904, 2008.

SILLS, D. L. e GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. **Bioresource Technology**, v.102, p. 1389-1398, 2011.

SILVA, A. S.; OLIVEIRA JR, A. M.; ABUD, A. K. S.; "Influência de inibidores no processo de fermentação etanólica de xilose por *Pachysolen tannophilus*", p. 30-36 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015.

SILVA, F.T. **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. 1995, 98 folhas. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007, 146 folhas. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. Ethanol

production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2011.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. **Revista do ISPV**, n. 28, 2003. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millennium/Millennium28/10.pdf>>. \ Acesso em: nov. 2013, 2003.

SILVA, N. L. C.; **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 Folhas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, O. G.; **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana de açúcar**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba.

SILVEIRA, R. F. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo**. 2007. 130 folhas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3000-3011, 2007.

SOUSA, T. M. D. **Estudo da hidrólise enzimática no tratamento de biomassa lignocelulósica usada como matéria-prima para a produção de biocombustível**. 2014, 48 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)- UFU: Universidade Federal de Uberlândia.

SPIGNO, G., PIZZORNO, T., De FAVERI, D.M. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4329–4337, 2008.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 918, 2008.

SU, C. H.; CHUNG, M. H.; HSIEH, H. J.; CHANG, Y. K.; DING, J. C.; WU, H. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar

production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 4, p. 573-577, 2012.

SUN, Y; CHENG, J. J; Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.96, p.1599-1606, 2005.

TAKAHASHI, C. M. **Produção de etanol por *Escherichia coli* geneticamente modificada: influência de fatores nutricionais**. 1998. 117 folhas. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 364-370, 1997.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHAROEDER, H. A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**, v. 16, p. 1070–1073, 1999.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.

VÁSQUEZ, M. P.; **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2007, 205 folhas. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

WANG, H.; WANG, J.; FANG, Z.; WANG, X.; BU, H. Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. **International Journal Hydrogen Energy**. v. 35, p. 8303-8309, 2010.

WERLE, L. B.; GARCIA, J. C.; KUHN, R. C.; SCHWAAB, M.; FOLETTO, E. L.; CANCELIER, A.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Ultrasound-assisted acid hydrolysis of palm leaves (*Roystonea oleracea*) for production of fermentable sugars. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 128-132, 2013.

WESTGARD, J. O.; BARRY, P. L.; HUNT, M. R.; GROTH, T. A. A multi-rules hewhart chart quality control in clinical chemistry. **Clinical Chemistry**, v. 27, p. 493-501, 1981.

WU, F. C.; HUANG, S. S.; SHIH, I. L. Sequential hydrolysis of waste newspaper and bioethanol production from the hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 159-168, 9// 2014.

XIANG, Q.; KIM, J. S.; LEE, Y. Y. A comprehensive kinetic model for dilute-acid hydrolysis of cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105-108:337e52, 2003.

XU, J.; CHENG, J. J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BURNS, J. C. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2113-2119, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, JR, CUI, J.B.; ELANDER, R. T.; LASER, M. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology Bioengineering**, v.97, p. 214-223, 2007.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1156-1161, 2008.

ZHU, J.; WAN, C.; LI, Y. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7523-7528, 2010.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z. N.; LIAO, J. T. e ZHANG, Y. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3082-3086, 2005.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z. N.; ZHANG, Y.; WANG, C. W.; YU, F. Q. e JIN, S. W. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.41, p. 869-873, 2006.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 18/03/2016

Nilson Antônio Moraes Nery de Almeida
Assinatura do autor