



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

Anelisa Doretto Freitas Furlan

Produção de Bioetanol de Segunda Geração pelo Consórcio
Zymomonas mobilis CCT4494 e *Candida tropicalis* em Resíduos de
Uvas Isabel e Bordô

São José do Rio Preto

2015

Anelisa Doretto Freitas Furlan

Produção de Bioetanol de Segunda Geração pelo Consórcio
Zymomonas mobilis CCT4494 e *Candida tropicalis* em Resíduos de
Uvas Isabel e Bordô

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, 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.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto

2015

Anelisa Doretto Freitas Furlan

Produção de Bioetanol de Segunda Geração pelo Consórcio
Zymomonas mobilis CCT4494 e *Candida tropicalis* em Resíduos de
Uvas Isabel e Bordô

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, 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.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto/SP
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Marcos de Lucca Jr.
IFSP – Barretos/SP

São José do Rio Preto
06 de Março de 2015

Aos meus pais, Nelson e Neli, aos meus irmãos Eduardo e Livia, à minha afilhada, Livia, às minhas avós, às minhas tias, Sônia, Meire e Solange (in memoriam) e ao meu marido, Márcio.

Dedico esta Dissertação a vocês, que me apoiaram e encorajaram para eu chegar até aqui.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao querido professor Crispin Humberto Garcia Cruz, obrigada pela orientação exemplar, pautada por um elevado e rigoroso nível científico, contribuindo para enriquecer todas as etapas subjacentes ao processo de investigação. Obrigada pela confiança depositada, pela oportunidade oferecida, pela partilha do saber, por estimular o meu interesse pelo conhecimento, pelo acompanhamento incansável nesta jornada, me encorajando para que eu prosseguisse e concluísse este trabalho. Orgulho-me de ter desenvolvido este estudo sob a sua orientação. Acima de tudo, obrigada por ter sido responsável pelo meu amadurecimento profissional. Jamais teria ido tão longe sem o seu auxílio, amizade e dedicação. Meu profundo respeito, admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço principalmente ao meu amado Deus, que com seu amor e sua imensa graça tem me dado forças para enfrentar todos os obstáculos da vida, permitido que eu realize todos os meus sonhos.
- À minha família, da qual sempre tive apoio total e um amor incondicional: meus pais, Nelson e Neli; meu irmão Eduardo; minha irmã, Livia; minha afilhada, Livia; meus sogros; meus cunhados; minhas avós, Adelaide, Leonora que sempre estiveram presentes em minha vida, me dando apoio e me erguendo em qualquer situação; a meus primos e tios, em especial, Sônia, Meire e Solange (*in memoriam*) pelo auxílio e carinho. Minha felicidade não se realizaria sem a participação de vocês.
- Ao meu marido, Márcio Spatini Furlan, por ser o meu porto seguro e anjo da guarda em todos os aspectos da minha vida, por todo amor, dedicação, carinho e conforto em todos os momentos. Com toda a certeza, se não estivesse do seu lado não seria tão feliz e completa.
- A todos os integrantes do Laboratório de Biopolímeros, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP- Campus de São José do Rio Preto/SP, pelo auxílio e companheirismo, tornando o laboratório um lugar agradável, em especial à Natália Righetti e Juliana Ferreira pela colaboração e atenção em todos os momentos.
- Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos; ao Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, especialmente aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação, pela agradável recepção e convivência diária.
- A CAPES pelo apoio financeiro.
- Aos membros da banca, Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Prof. Dr. Marcos de Lucca Jr. e Márcia Luzia Rizzatto, por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho.

*"A glória da amizade não é só a mão estendida, o sorriso carinhoso
nem mesmo a companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você
descobre que alguém acredita e confia em você".*

Anônimo.

E a todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho,

Muito Obrigada!

RESUMO

A produção de etanol combustível a partir de resíduos lignocelulósicos, como tecnologia emergente, conhecida como bioetanol de segunda geração, está sendo bastante pesquisada em virtude de uma preocupação com o desenvolvimento de fontes energéticas renováveis e mais limpas. Neste contexto as indústrias vinícolas têm destaque, já que o subproduto gerado por elas, bagaço e engaço, por exemplo, é de lenta decomposição. Ao mesmo tempo em que há buscas por novos substratos, há também por micro-organismos capazes de fermentar monossacarídeos presentes nestes resíduos para produzir bioetanol, e também que estes consigam fermentar em consórcio sem que haja competição entre eles para o melhor aproveitamento destas fontes de carbono. Neste trabalho foram realizadas fermentações pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e pela levedura *Candida tropicalis* em hidrolisados ácidos dos resíduos de uvas das espécies Isabel e Bordô, para isto, foi utilizada a concentração de ácido sulfúrico de 1,5% com aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm². Foram realizadas também, fermentações utilizando meios semi-sintéticos com glicose e xilose (50 g/L) como substratos para a *Z. mobilis* e *C. tropicalis*, respectivamente. Nas fermentações realizadas pela bactéria *Z. mobilis*, utilizando tanto a mistura (50% bagaço e 50% engaço) dos resíduos quanto apenas o engaço não houve detecção de etanol por cromatografia gasosa. Com o meio semi-sintético, em 8 horas de fermentação, foram produzidos 17,0 g/L de etanol. Durante as fermentações efetuadas pela levedura *C. tropicalis*, houve produção de etanol de 1,04 g/L e 5,89 g/L em 6 horas de fermentação utilizando a mistura dos resíduos e o engaço, respectivamente e, 18,56 g/L em 8 horas em meio semi-sintético. No consórcio dos micro-organismos, a produção de etanol, utilizando primeiramente a mistura e depois o engaço foi de 0,72 g/L e 1,15 g/L, ambas em 8 horas de fermentação e 19,35 g/L em meio semi-sintético no mesmo tempo. Todos os experimentos foram realizados a 30 °C, pH 6, concentração de hidrolisado de 5 % (m/v) e em meios estáticos.

Palavras chaves: Resíduos de uvas. Bioetanol de segunda geração. Consórcio. *Zymomonas mobilis*. *Candida tropicalis*.

ABSTRACT

*The production of fuel ethanol from lignocellulosic residues, as an emerging technology, known as second-generation bioethanol is being extensive research because of a concern with the development of renewable and cleaner energy sources. In this context, the wine industry has highlighted, since the by-product generated by them, bagasse and stems, for example, is the slow decomposition. While there search for new substrates, there are also micro-organisms capable of fermenting monosaccharides present in these residues to produce bioethanol, and also that they are able to ferment in a consortium without competition between them for better use of these carbon sources . In this work were carried out fermentations by *Zymomonas mobilis* CCT 4494 bacteria and the yeast *Candida tropicalis* in hydrolyzed acid waste grape species Isabel and Bordô, for this, we used the sulfuric acid concentration of 1.5% with heating in an autoclave at 121 °C and 1 kgf/cm². Were also carried out using fermentation semi-synthetic environment containing glucose and xylose (50 g/L) as substrates for the *Z. mobilis*, and *C. tropicalis*, respectively. All fermentations carried by the bacteria *Z. mobilis* using both the mixture (50% bagasse and 50% stems) of the waste just as there wasn't stems ethanol detection by gas chromatography, as with the semi-synthetic environment in the 8 hours fermentation were produced 17.0 g/L of ethanol. During the fermentations carried by the yeast *Candida tropicalis*, ethanol production was 1.04 g/L and 5.89 g/L in 6 hours of fermentation using the mixture of waste and the stems, respectively, and 18.56 g/L in 8 hours in semi-synthetic environment. In the consortium of micro-organisms, the production of ethanol, using first the mixture and then the stems was 0.72 g/L and 1.15 g/L, both in 8 hours and the fermentation and the semi-synthetic environment 19.35 g/L at the same time. All experiments were performed at 30 °C, pH 6, hydrolyzate concentration of 5 % (w/v) and environment without agitation.*

*Keywords: grape waste. Second-generation bioethanol. Consortium. *Zymomonas mobilis*. *Candida tropicalis*.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fermentação alcoólica (TORTORA et al., 2005).....	21
Figura 2 -	Produção agrícola brasileira de matérias-primas (FERREIRA, 2012).....	27
Figura 3 -	Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (LEE, 1997).....	28
Figura 4 -	Estrutura de um material lignocelulósico (SILVA et al., 2009).....	30
Figura 5 -	Estrutura química de celulose (MORAIS, 2005).....	31
Figura 6 -	Esquema da parede celular vegetal (BUCKERIDGE, 2007).....	32
Figura 7 -	Componentes da fração hemicelulósica (MORAIS, 2005).....	33
Figura 8 -	Precusores primários da lignina (D'ALMEIDA, 1998).....	35
Figura 9 -	Estrutura da matéria lignocelulósica antes e após o pré-tratamento (BALAT, 2010).....	37
Figura 10 -	Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 5 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	53
Figura 11 -	Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 5 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	54
Figura 12 -	Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 10 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	55
Figura 13 -	Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 10 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	55
Figura 14 -	Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 15 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	56
Figura 15 -	Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 15 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm ²	56

Figura 16 -	Variação do pH da fermentação realizada pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempo de 12, 24, 36 e 48 horas incubado a 30 °C.....	58
Figura 17 -	Crescimento da Biomassa durante a fermentação realizada pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempo de 12, 24, 36 e 48 horas incubado a 30 °C.....	59
Figura 18 -	Variação do pH da fermentação realizada pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	60
Figura 19 -	Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	61
Figura 20 -	Variação do pH durante a fermentação realizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	62
Figura 21 -	Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	63
Figura 22 -	Produção de etanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	64
Figura 23 -	Variação do pH durante a fermentação realizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	65
Figura 24 -	Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	66
Figura 25 -	Produção de etanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	66
Figura 26 -	Variação de pH durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30°C.....	68
Figura 27 -	Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	68
Figura 28 -	Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	69
Figura 29 -	Variação do pH durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	70

Figura 30 -	Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	70
Figura 31 -	Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	71
Figura 32 -	Variação do pH durante as fermentações em meios semi-sintéticos pelos micro-organismos nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	72
Figura 33 -	Crescimento da biomassa durante as fermentações realizadas pelos micro-organismos em meios semi-sintéticos nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	73
Figura 34 -	Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos em meio semi-sintético nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C.....	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composição do bagaço de uva, em diversas condições de 25
prensagem, segundo Muentz e Degrully
- Tabela 2 - Diferenças entre celulose e hemicelulose (PEREIRA Jr. et al., 34
2008).....

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Fermentação alcoólica	19
2.2. Uva.....	22
2.3. Resíduos de uva	24
2.4. Bioetanol	26
2.5. Resíduos lignocelulósicos.....	29
2.5.1. Celulose.....	31
2.5.2. Hemicelulose	33
2.5.3. Lignina	34
2.6. Hidrólise de resíduos lignocelulósico	35
2.7. Micro-organismos produtores de bioetanol	37
2.8. <i>Zymomonas mobilis</i>	38
2.9. <i>Candida tropicalis</i>	39
2.10. Consórcio de micro-organismos	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Geral.....	42
3.2. Específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Resíduos de uva	43
4.2. Hidrólise dos resíduos de uva	43
4.2.1. Padronização da hidrólise.....	43
4.3. Micro-organismos e meios de cultura.....	44
4.3.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	44
4.3.1.1. Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação	44
4.3.1.2. Meio de fermentação	45
4.3.1.3. Preparo do pré-inóculo	45
4.3.1.4. Pré-fermentação	45
4.3.2. <i>Candida tropicalis</i>	45
4.3.2.1. Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação	46
4.4. Fermentações com hidrolisados ácidos.....	46

4.4.1. Experimento I – Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas (50 % engaço e 50 % bagaço fermentado) como substrato para a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	46
4.4.1.1. Padronização do inóculo	47
4.4.2. Experimento II – Fermentação com a utilização do hidrolisado ácido do engaço de uva como substrato pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	48
4.4.3. Experimento III – Fermentação com a utilização do hidrolisado ácido do engaço de uva como substrato pela levedura <i>Candida tropicalis</i>	48
4.4.3.1. Padronização do inóculo	48
4.4.4. Experimento IV – Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas (50 % engaço e 50 % bagaço fermentado) como substrato pela levedura <i>Candida tropicalis</i>	49
4.4.5. Experimento V - Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas como substrato pelo consórcio de micro-organismos	50
4.5. Fermentações em meios semi-sintéticos	50
4.5.1. <i>Zymomonas mobilis</i> em meio semi-sintético	50
4.5.2. <i>Candida tropicalis</i> em meio semi-sintético	50
4.5.3. Consórcio em meio semi-sintético	51
4.6. Métodos analíticos	51
4.6.1. Determinação de açúcares redutores (AR)	51
4.6.2. Determinação de etanol por cromatografia gasosa	51
4.6.3. Determinação do pH	52
4.6.4. Determinação da Concentração Celular	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Padronização da hidrólise dos resíduos de uva	53
5.2. Fermentações com hidrolisados ácidos	58
5.2.1. Experimento I: <i>Zymomonas mobilis</i> com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva	58
5.2.1.1. Crescimento celular	59
5.2.1.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa	59
5.2.2. Experimento II: <i>Zymomonas mobilis</i> com o hidrolisado ácido do engaço dos resíduos de uva	60
5.2.2.1. Crescimento celular	61
5.2.2.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa	62

5.2.3. Experimento III: <i>Candida tropicalis</i> com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva	62
5.2.3.1. Crescimento celular	63
5.2.3.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa.....	63
5.2.4. Experimento IV: <i>Candida tropicalis</i> com o hidrolisado ácido do engaço de uva ..	64
5.2.4.1. Crescimento celular	65
5.2.4.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa.....	66
5.2.5. Experimento V: Consórcio dos micro-organismos com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva	67
5.2.5.1. Crescimento celular	68
5.2.5.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa.....	69
5.2.6. Experimento VI: Consórcio dos micro-organismos com o hidrolisado ácido do engaço de uva	69
5.2.6.1. Crescimento celular	70
5.2.6.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa.....	71
5.3. Fermentações utilizando meios semi-sintéticos.....	71
5.2.5.1. Crescimento celular	72
5.2.5.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa.....	73
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICES	88
Apêndice 1A: Concentração de glicose e absorbância (490 nm) para padronização da curva padrão de açúcares totais.....	88
Apêndice 1.1A: Curva padrão para açúcares totais.	88
Apêndice 2A: Concentração de glicose e absorbância (540 nm) para construção da curva padrão de açúcares redutores.....	89
Apêndice 2.1A: Curva padrão para açúcares redutores	89
Apêndice 3A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para construção da curva padrão do crescimento celular	90
Apêndice 3.1A: Curva padrão da biomassa da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> após 72 horas de crescimento.	90
Apêndice 4A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria <i>Candida tropicalis</i> para construção da curva padrão do crescimento celular	91

Apêndice 4.1A: Curva padrão da biomassa da levedura <i>Candida tropicalis</i> após 72 horas de crescimento.	91
Apêndice 5A: Produção de etanol por cromatografia gasosa.	92
Apêndice 5.1A: Curva padrão da produção de etanol por cromatografia gasosa.	92

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, em razão da escassez e alta de preços dos combustíveis fósseis e da poluição por eles causada, é a produção e utilização do etanol como combustível, visto que este produto apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, e de contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono (EMBRAPA, 2011).

A crise do petróleo, na década de 70, conduziu ao desenvolvimento do Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), que visava, principalmente, substituir a gasolina por um combustível alternativo. Através do Pró-álcool, pesquisadores brasileiros foram encorajados a desenvolver processos de produção de um biocombustível com baixos custos. Optou-se, então, pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar por via fermentativa, em razão da baixa nos preços do açúcar na época. No início do século XXI, na certeza de escassez e de crescente elevação no preço dos combustíveis fósseis, priorizam-se novamente os investimentos na pesquisa e produção de etanol (ALTINTAS et al., 2002).

O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura de 22% a 25% de álcool na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO₂. Atualmente, o Brasil produz 25 bilhões de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar (MAPA, 2010). Embora a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar seja um processo bem estabelecido no Brasil, há muito investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação para produção desse biocombustível a partir de tecnologias de segunda geração (EMBRAPA, 2014).

O bioetanol de segunda geração é aquele que é produzido através de resíduos industriais, agrícolas e florestais, visto que estes são chamados de materiais lignocelulósicos, sendo que são fontes de açúcares que podem servir como alimento (substrato) para os micro-organismos em uma fermentação. Além de possuírem açúcares fermentescíveis, estes tipos de resíduos tem custo reduzido, o que auxiliaria na produção mais barata do bioetanol e diminuiria a quantidade de resíduos descartados no meio ambiente (SILVA, 2010).

As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20% a 60% de celulose, além de hemicelulose e lignina, que podem ser totalmente convertidas à

glicose por pré-tratamentos para desorganização do complexo lignocelulósico. Por sua vez, a glicose caracteriza-se por ser um monossacarídeo utilizado pela maioria dos micro-organismos, fazendo desta molécula um importante bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de substâncias de interesse comercial, abrangendo desde combustíveis até polímeros (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004; SILVA, 2010).

Entretanto, há a necessidade de realizar um tratamento prévio no substrato para que haja a liberação dos açúcares fermentescíveis, pois na estrutura natural, os micro-organismos não conseguem ter acesso a eles. Um tipo de tratamento bastante utilizado para esta finalidade é a hidrólise; sendo que esta pode ser ácida, básica ou enzimática (COLOMBARI, 2012).

Ao mesmo tempo em que há busca por novos substratos, há também por micro-organismos capazes de fermentar monossacarídeos presentes nos resíduos para produzir bioetanol, e também micro-organismos que consigam fermentar em consórcio (fermentação com mais de um micro-organismo) estes substratos sem que haja competição entre eles (FLORENCIO, 2011).

Portanto o presente trabalho visa produzir bioetanol de segunda geração empregando o consórcio entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Candida tropicalis* utilizando como substrato açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise ácida de resíduos de uvas das espécies Isabel e Bordô. Para isto, foram utilizados como substratos o engaço isoladamente e a mistura do engaço e bagaço fermentado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fermentação alcoólica

Desde a antiguidade produtos de fermentação são utilizados pelo homem. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C. (VILLEN 2009).

No século XVII, atribuiu-se a Bechner, a afirmação de que só os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Para este pesquisador, o álcool se formava durante o processo de fermentação, acreditando erradamente, a necessidade de ar para causar o fenômeno. Black, no século XVIII, caracterizou os primeiros estudos sobre fermentação alcoólica e postulou que o álcool etílico e o gás carbônico eram os únicos produtos formados do açúcar durante a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

Entretanto, Lavoisier, em 1789, foi o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica. Coube a Pasteur (1857), a explicação clara sobre a natureza deste processo. Segundo este pesquisador, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,9 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 partes de ácido succínico e uma parte de outras substâncias (MENEZES, 1980).

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Um dos fatores que torna a produção de bioetanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (PEREIRA JÚNIOR et al., 2008).

O processo de fermentação alcoólica, tanto em nível laboratorial quanto industrial, consiste em uma série de reações químicas catalisadas por um ou mais micro-organismos que metabolizam açúcares fermentescíveis de um substrato, convertendo-os, principalmente, em etanol e dióxido de carbono, em condições físicas e químicas pré-determinadas. Inicia-se com a glicólise, também chamada de

via Embden-Meyerhof, na qual ocorre a oxidação da glicose em dois ácidos pirúvicos em duas etapas, podendo ocorrer na presença de oxigênio ou não. Na primeira etapa, duas moléculas de ATP são utilizadas enquanto uma molécula de glicose é fosforilada, reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que são imediatamente convertidos em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, duas moléculas de NAD^+ são reduzidas a NADH e quatro moléculas de ATP (adenosina trifosfato) são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As moléculas de acetaldeído são então reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, produto final da fermentação (Figura 1) (TORTORA et al., 2005). Entretanto, juntamente com o etanol e o CO_2 , o metabolismo leva também a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetona, butilenoglicol e outros componentes de menor significado quantitativo. Além disso, ocorre simultaneamente o crescimento de micro-organismos (GUTIERREZ et al., 1991).

O conhecimento de como é conduzida laboratorialmente e quais são as reações químicas de uma fermentação alcoólica orienta o pesquisador em como este pode alcançar resultados de qualidade e enriquecedores para sua linha de pesquisa.

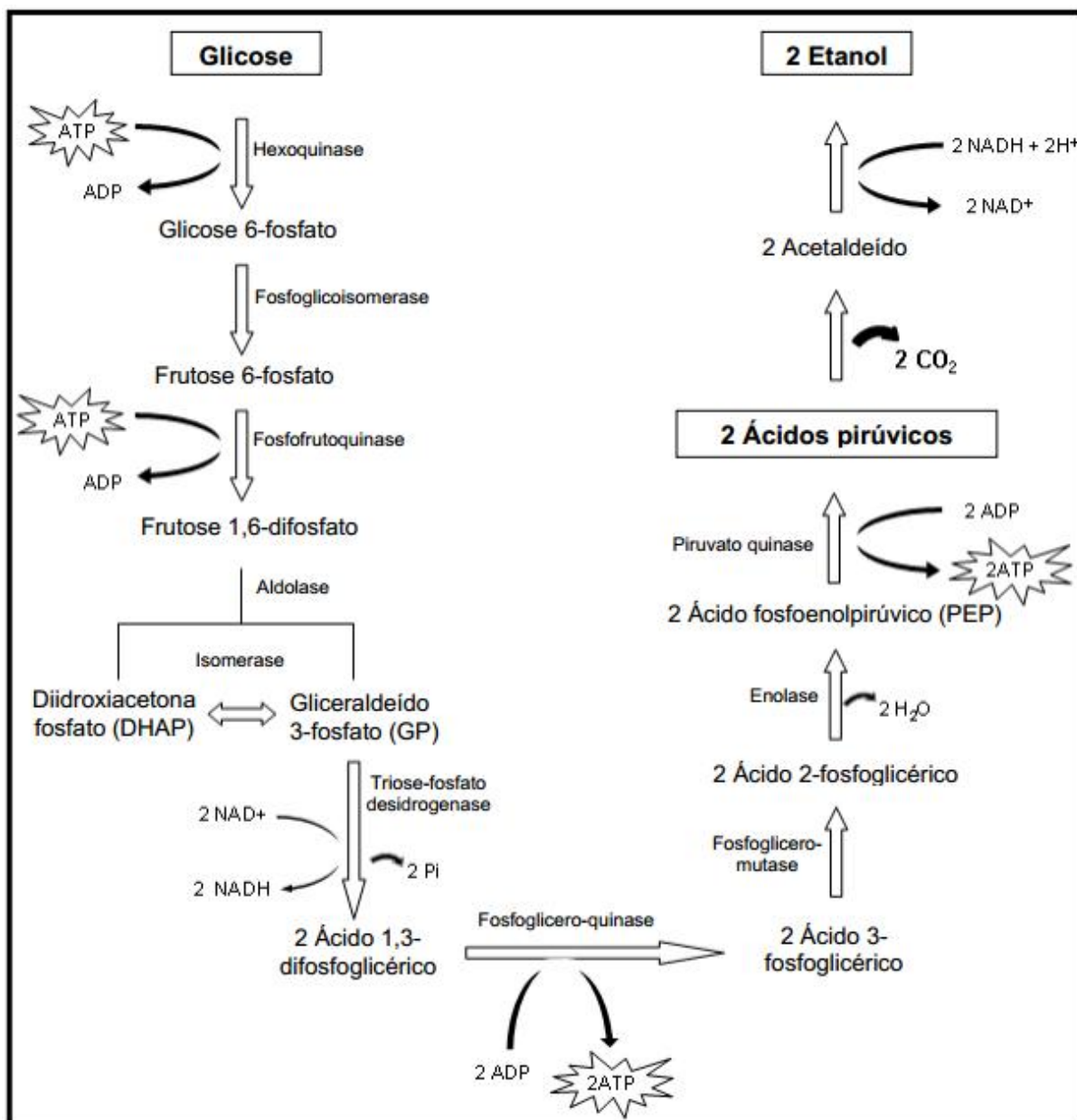


Figura 1: Fermentação alcoólica. Fonte: TORTORA et al., 2005

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo que mais se emprega na fermentação alcoólica, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana de açúcar ou da celulose de biomassas residuais (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Entretanto outras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras de etanol, podendo-se citar a *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. mogii* (CASSALES, 2010).

Segundo Silva (2010), dentre as bactérias, a mais promissora é a *Zymomonas mobilis*, que tem alta eficiência energética resultando num alto rendimento de etanol (maior que 90%). No entanto, uma das desvantagens do uso desta bactéria na fermentação do caldo de cana e de outros meios com sacarose é a formação de polissacarídeos, que aumenta a viscosidade do meio de fermentação, e de sorbitol, um produto da redução da frutose que diminui a eficiência da conversão de sacarose a etanol (SILVA, 2010). Outra desvantagem deste micro-organismo é que após a fermentação, as indústrias reaproveitam o micro-organismo para realizar novas fermentações, para isso há a necessidade de realizar um tratamento, muitas vezes com utilização de ácidos para possibilitar este retorno, sendo assim, com a redução brusca do pH, bactérias, como é o caso da *Z. mobilis* podem não resistir e como resultado o não reaproveitamento destas.

2.2. Uva

A videira (*Vitis*) é uma planta trepadeira com gavinhas, lenhosa e de porte arbustivo, suas folhas são alternas, pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior. As flores são pequenas e de cor branco esverdeada, dispostas em racimos. Os frutos são bagas reunidas em cachos, contendo cada uma duas ou três sementes variando de cor de acordo com o tipo de uva (MANICA, 2012).

Existem diversas espécies de uva, porém as mais conhecidas no Brasil são: uva Isabel, Itália, Niagara, Branca, Rosada e Bordô. A uva é uma fruta rica em sais minerais, tais como: cálcio, ferro, fósforo, magnésio, sódio e potássio. Possui também, em quantidade razoável, vitaminas (complexo B e vitamina C). Não é muito calórica, pois 100 gramas de uva possuem, aproximadamente, 50 calorias (MANICA, 2012).

A uva Isabel é uma das principais cultivares de *Vitis labrusca*, espécie originária do Sul dos Estados Unidos onde foi difundida para as outras regiões. Esta é a mais plantada na Serra Gaúcha e na Zona da Mata de Pernambuco com grande demanda para elaboração de vinho tinto comum, suco, vinagre e geleias, além de ser comercializada “*in natura*” com boa aceitação no mercado (RIZZON et al., 2000).

Fenotipicamente, a uva Isabel apresenta-se como uma uva de cacho pequeno e solto, formado por um número reduzido de bagas de tamanho grande. Além disso, apresenta pH de 3,27; acidez total de 52 meq/L e 18,61 °Brix (EMBRAPA, 1984).

A cultivar Bordô, assim como a Isabel, é de origem americana sendo uma das principais representantes da espécie *Vitis labrusca*. Foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839 sob a denominação de 'Ives' e se expandiu pelas demais regiões devido à fácil adaptação às condições climáticas e à boa produtividade e longevidade, características de espécies rústicas (ZANUS; CAMARGO, 2009).

Em seu estágio ideal de maturação dificilmente atinge 17° Brix, mas uma de suas características mais marcantes é o elevado poder corante (RIZZON et al., 2000). Esta cultivar apresenta cacho pequeno com formato cilíndrico-cônico alado e bagas pequenas de coloração preta com polpa mucilaginosa. Apresenta teor de sólidos solúveis até 16,02 °Brix, com acidez total de 65 meq/L e pH de 3,29 (EMBRAPA, 1984).

A viticultura brasileira ocupa, atualmente, uma área de 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador. Duas regiões se destacam: o Rio Grande do Sul por contribuir, em média, com 777 milhões de quilos de uva por ano, e os polos de frutas de Petrolina/ PE e de Juazeiro/BA, no Submédio do Vale do São Francisco, responsável por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa (MAPA, 2014).

Embora a produção de vinhos, suco de uva e derivados da uva e do vinho também ocorra em outras regiões, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação) (MAPA, 2014).

No Brasil, como também em outros países, a uva é muito utilizada para a fabricação de sucos, doces, vinhos e geleias. O seu sabor varia muito de acordo com o tipo de solo, podendo ser doce, cítrico ou ácido. É uma fruta típica da região asiática, sendo que o plantio foi introduzido no Brasil na época da colonização portuguesa (MANICA, 2012).

2.3. Resíduos de uva

Resíduo é todo material descartado, individual ou coletivamente, pela ação humana, animal ou por fenômenos naturais, que seja nocivo à saúde, ao meio ambiente e, ao bem-estar da população (FERRARI, 2010)

O Brasil tornou-se destaque no cenário econômico mundial por conta de sua ampla atividade agrícola, porém devido a esta atividade está entre os países que mais geram resíduos agroindustriais. Dessa forma, é necessário buscar alternativas de reaproveitamento ou criação de novos produtos para evitar que estes subprodutos sejam causa de poluição e agressão ao meio ambiente. Segundo Oliveira et al. (2009), a indústria vinícola tem grande interesse nestas tecnologias já que os subprodutos gerados por ela são de lenta decomposição causando grande impacto ambiental. Dentro deste ramo industrial, os principais subprodutos que podem ter algum interesse econômico potencial são o engaço, o bagaço, sementes, material filtrado dos líquidos e outros.

O engaço é formado pela armação do cacho da uva que suporta o fruto, representa de 3% a 7% do peso total do cacho. É um subproduto vinícola de origem lignocelulósica, com 30-31% de celulose, 21% de hemicelulose, 17-18% de lignina, 15-16% de taninos e cerca de 6,0% de proteínas (PROZIL, MENDES, EVTUGUIN, LOPES, 2013).

Segundo Gobbato (1942), em geral, para cada 100 partes de engaço se encontram: de 50 a 80 partes de água; de 15 a 41 partes de substâncias lenhosas; de 0,8 a 2,5 partes de tanino; de 0,9 a 1,6 partes de flobafena ou anidrido do tanino; de 0,5 a 1,2 partes de ácidos livres expressos em ácido tartárico; de 0,7 a 1,6 partes de cremor de tártaro; e de 0,8 a 3,4 partes de substâncias minerais.

O bagaço é constituído pela película, as sementes e os restos da polpa da uva, como resultado do esmagamento da fruta através de um processo de separação do suco ou mosto. Em condições normais, o bagaço equivale a 15 a 20% do peso da fruta (MONRAD et al., 2010; BAGCHI et al., 2000; SHRIKHANDE, 2000; LLOBERA; CANELLAS, 2007). Após a produção de sucos e vinhos, este resíduo tipicamente retém compostos polifenólicos, de 20 a 30% nas cascas e 60 a 70% nas sementes. Entre os principais compostos fenólicos presentes nesses resíduos se encontram os flavonóides (MONRAD et al., 2010).

A composição química do bagaço de uva, dependendo da intensidade da prensagem sofrida no processo industrial, é mostrada na Tabela 1, segundo análises de Muentz e Degrully (CATALUÑA, 1991).

Tabela 1: Composição do bagaço de uva, em diversas condições de prensagem, segundo Muentz e Degrully

Componentes	Segundo Muentz		Segundo Degrully	
	Prensada natural	Prensada total	Prensada	Não prensada
Água e vinho	57,20%	63,70%	70,00%	70,00%
Matéria nitrogenada	4,28%	4,16%	3,35%	2,92%
Matéria graxa	1,01%	1,00%	2,36%	3,28%
Matéria extrativa	19,06%	17,86%	17,45%	16,30%
Celulose (lenhosa)	8,13%	8,13%	4,06%	4,65%
Cinzas	-	-	2,93%	2,76%
Álcool	6,50%	Traços	-	-

Fonte: CATALUÑA (1991)

Existem diversos estudos que mostram a utilização dos subprodutos da indústria vinícola, como a fabricação de farinha de semente e casca de uva que possui um grande poder antioxidante (OLIVEIRA et al., 2009). A utilização da casca de uva para produção e caracterização de aromas de frutas (UENOJO, 2003) também tem sido amplamente estudada. Outra maneira da utilização deste resíduo poderia ser a produção de etanol utilizando a biomassa do bagaço, cascas e sementes pela rota química e biológica envolvendo basicamente dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol.

Considerando que na região sudeste do Brasil há inúmeras viniculturas (Embrapa, 2010) que, por sua vez, geram resíduos como o bagaço e o engaço, originou-se a ideia de pesquisar e analisar o reaproveitamento destes por meio da produção de bioetanol de segunda geração com o intuito de retirá-los do meio ambiente e agregar-lhes valor econômico.

2.4. Bioetanol

Os biocombustíveis são geralmente produzidos a partir de materiais biodegradáveis através de processos termoquímicos como pirólise, gaseificação, liquefação, extração com fluidos supercríticos, entre outros (BALAT, 2010).

O etanol é o que possui maior destaque no cenário mundial dentre os biocombustíveis mais utilizados. O mesmo pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas e o processo de produção utiliza diferentes tecnologias de conversão, que podem ser de primeira ou de segunda geração (PITARELO et al., 2012).

Após a primeira crise do preço do petróleo em 1973, iniciou-se a produção de etanol no Brasil. O Programa Pró-Álcool surgiu em 1975, e visava à redução da dependência da importação do petróleo. A partir de 2006 o Brasil se tornou autossuficiente no abastecimento do petróleo e a produção de biocombustíveis continuou, a fim de diminuir a emissão de dióxido de carbono associado ao efeito estufa (KOHLHEPP, 2010).

O etanol é um dos produtos químicos orgânicos com maior volume de produção industrial. A fermentação alcoólica teve importância após a crescente procura principalmente como combustível para automóveis. Este processo desejável deve ser rápido e ter alta produção, além de minimizar o custo do capital investido e de energia durante a destilação. Portanto o substrato é o principal custo componente na produção industrial, por isso, é necessário que este substrato seja de baixo custo (RATNAM et al., 2005), como os resíduos lignocelulósicos.

Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação alcoólica dos carboidratos presentes, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar, a segunda geração consiste na produção de etanol celulósico a partir da quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal dos resíduos lignocelulósicos (PITARELO et al., 2012).

A produção de etanol torna possível a substituição de combustíveis fósseis e, portanto, produzir etanol a partir de celulose tem despertado interesse em diferentes centros de pesquisa de países desenvolvidos, já que se torna uma matéria-prima de menor custo, uma vez que pode ser obtido de resíduos agrícolas ou resíduos

florestais, sendo este etanol, chamado de bioetanol de segunda geração (SANTOS et al., 2009).

A utilização destes resíduos na elaboração de bioetanol precisa ser vantajosa, para isso estes devem proporcionar alta produtividade, alta concentração de bioetanol durante o processo de destilação e redução na demanda de energia (SOCCOL et al., 2011).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento, conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, são basicamente em escala experimental de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO et al., 2008).

Este composto pode ser produzido a partir de diversos tipos de matérias-primas. Estas são classificadas em três categorias de produtos agrícolas: matérias-primas contendo sacarose (de cana de açúcar, beterraba, sorgo doce e frutas), materiais de amido (milho, sorgo, trigo, arroz, batata, mandioca, batata-doce e cevada) e materiais lignocelulósicos (madeira, palha e capim) (BALAT, 2010). A Figura 2 ilustra a produção brasileira de matérias-primas que estão inseridas nestas três categorias de produtos agrícolas.



Figura 2: Produção agrícola brasileira de matérias-primas. Fonte: (FERREIRA, 2012)

Atualmente, os materiais lignocelulósicos são mais utilizados na produção de etanol devido a sua alta rentabilidade. Os mesmos podem ser divididos em seis grupos principais, a saber, resíduos de colheitas (bagaço de cana, palha de milho, etc.), madeira de lei (álamo alpino e álamo), madeira conífera (pinheiro e abeto), resíduos celulósicos (lodo da indústria de papel, papel reciclado, jornais, etc.), biomassa herbáceos (feno de alfafa, caníço-malhado, etc.) e resíduos sólidos municipais (CARDONA et al., 2010)

Uma vez que os resíduos utilizados são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (Figura 3) (LEE, 1997) e, que quando rompidos liberam açúcares fermentescíveis, principalmente glicose e xilose. Uma forma de liberar estes açúcares é a hidrólise ácida, na qual se empregam ácidos como o ácido sulfúrico, além da hidrólise básica e enzimática. Além disso, o etanol celulósico reduz em 85% a emissão de dióxido de carbono quando comparado com a queima da gasolina, diminuindo assim a chuva ácida. No Brasil, 15% dos automóveis são movidos por etanol puro (WEI et al., 2014). Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER et al., 2002).

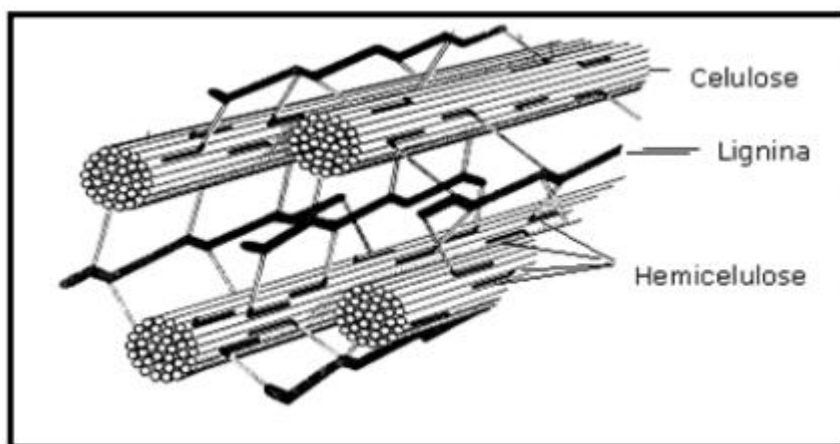


Figura 3: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.

Fonte: LEE, 1997

2.5. Resíduos lignocelulósicos

Em geral, denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. Portanto, são exemplos, a lenha, os resíduos de serrarias, o carvão vegetal, o biogás resultante da decomposição de lixo orgânico e de outros resíduos agropecuários, bem como os biocombustíveis líquidos, como o bioetanol e o biodiesel. No amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido considerada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. Para esses fins, ainda não existem outras alternativas renováveis, além dos biocombustíveis, com maturidade tecnológica e viabilidade econômica suficientes (ZHANG; SMITH, 2007).

Os materiais lignocelulósicos são polímeros de carboidratos complexos compostos, basicamente, por três compostos: celulose $(C_6H_{10}O_5)_x$, hemicelulose $(C_5H_8O_4)_m$ e lignina $(C_9H_{10}O_3(OCH_3))_n$. Estes componentes representam cerca de 90% da massa seca do material. Os 10% restantes consiste em extrativos e cinzas (BALAT, 2010).

Resíduos agrícolas, florestais e de indústrias alimentícias são chamados de resíduos lignocelulósicos. A celulose, juntamente com a hemicelulose e com a lignina, formam a estrutura lignocelulósica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; WANG et al., 2012). Exemplos de resíduos lignocelulósicos são o bagaço de cana, palha de milho, bagaço de uva, engaço de uva, casca de soja, farelo de trigo casca de arroz, entre outros (BURANOV; MAZZA, 2008).

A molécula mais abundante no mundo é a celulose e é encontrada em madeiras e parede celular de plantas. A celulose se localiza na parte central na estrutura da planta, ela é envolvida pela hemicelulose que por sua vez é envolvida pela lignina (TAMANINI; HAULI, 2004; CASSALES, 2010)

A hemicelulose possui baixo peso molecular quando comparada com a celulose, e apresenta cadeia ramificada. Localiza-se entre a celulose e a lignina. É constituída pelas pentoses xilose e arabinose e pelas hexoses glicose, galactose e manose (LIU et al., 2011).

Seguido da celulose, a lignina é o composto mais abundante. Possui estrutura rígida que serve como proteção para a planta contra micro-organismos (BURANOV; MAZZA, 2008). Este composto é incorporado à parede celular, conforme o crescimento da planta (RABELO, 2007). Pode-se verificar tal afirmação conforme a Figura 4, a qual demonstra a estrutura de um material lignocelulósico.

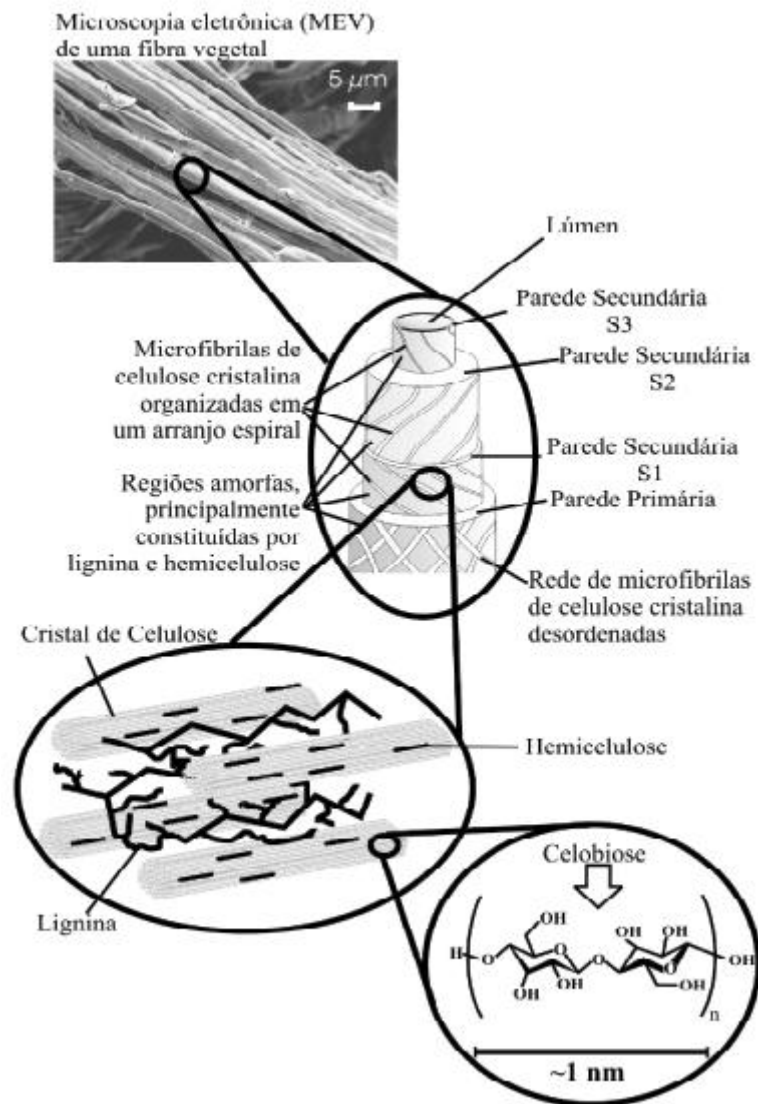


Figura 4: Estrutura de um material lignocelulósico. Fonte: SILVA et al., 2009

2.5.1. Celulose

A celulose (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (Figura 5) (ARANTES; SADDLER, 2010).

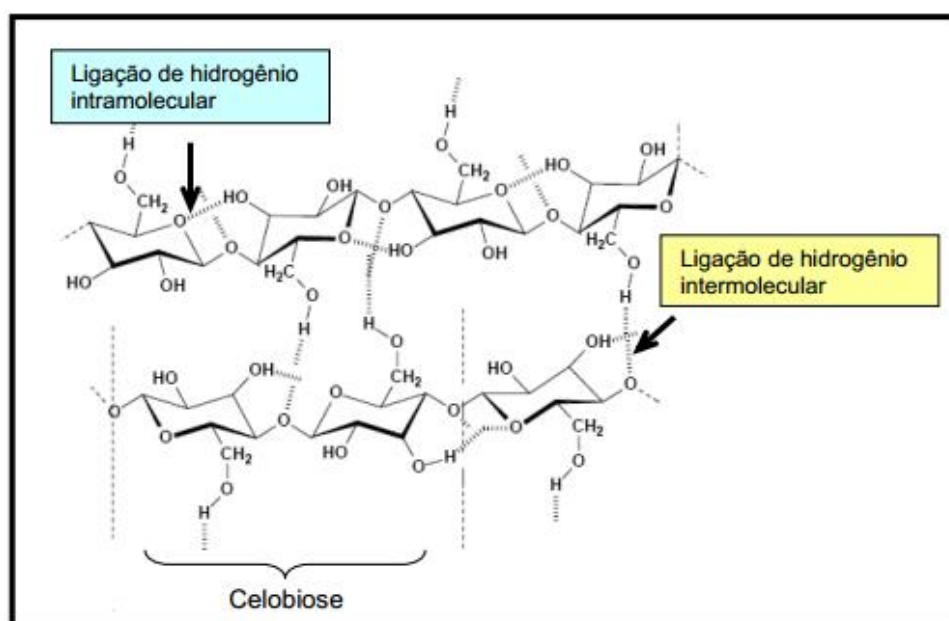


Figura 5: Estrutura química de celulose. Fonte: MORAIS, 2005

As cadeias de celulose são empacotadas em microfibrilas, que são estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio (BRODEUR et al., 2011; HENDRIKS et al., 2009). A Figura 6 mostra a estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose depositadas umas sobre as outras.

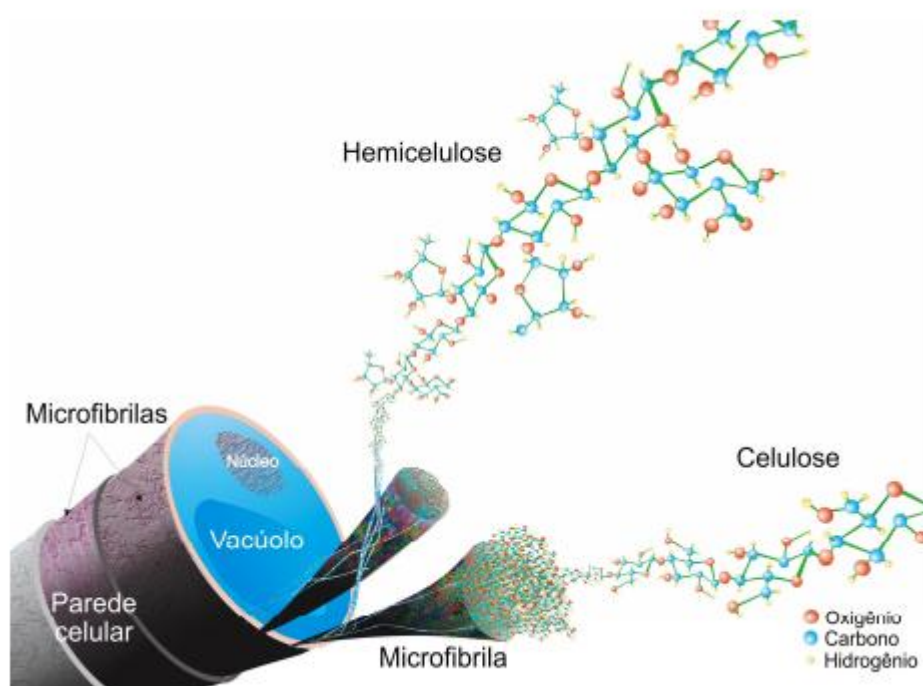


Figura 6 - Esquema da parede celular vegetal. Fonte: (BUCKERIDGE, 2007)

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose (VÁSQUEZ et al., 2007).

O índice de cristalinidade e o grau de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

2.5.2. Hemicelulose

Por sua vez, a fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente pentoses, como xilose e arabinose, e por hexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, e deoxiexoses (Figura 7). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA et al., 2009).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SUN; CHENG, 2005).

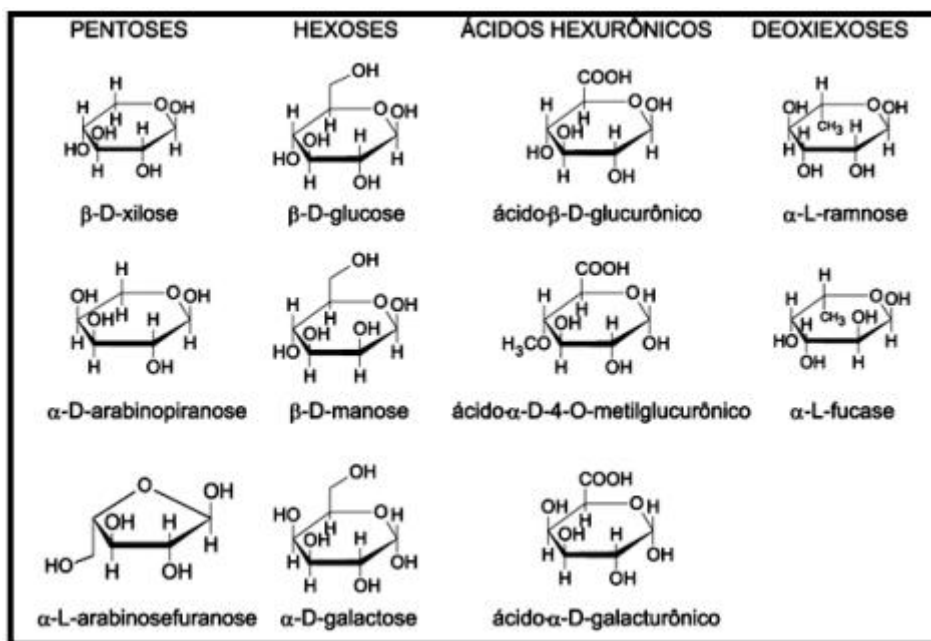


Figura 7: Componentes da fração hemicelulósica. Fonte: MORAIS, 2005

A Tabela 2 resume as principais características da celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é de fundamental importância para a definição

das estratégias de aproveitamento das biomassas como matérias-primas para a produção de bioetanol e de outras substâncias químicas.

Tabela 2. Diferenças entre celulose e hemicelulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
- Unidades de glicose unidas entre si	- Unidades de diferentes pentose e hexoses ligadas entre si
- Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidade de glicose)	- Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
- Forma arranjo fibroso	- Não forma arranjo fibroso
- Apresenta regiões amorfas e cristalinas	- Apresenta somente regiões amorfas
- É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	- É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
- É insolúvel em álcalis	- É solúvel em álcalis

Fonte: PEREIRA Jr. et al. (2008)

A hemicelulose atua formando ligações entre a lignina e as fibras de celulose conferindo rigidez e promovendo a integração da rede celulose-hemicelulose-lignina (HENDRIKS et al., 2009).

2.5.3. Lignina

A estrutura bioquímica da fração lignina (10% - 30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 8) (LEMOS, 2001).

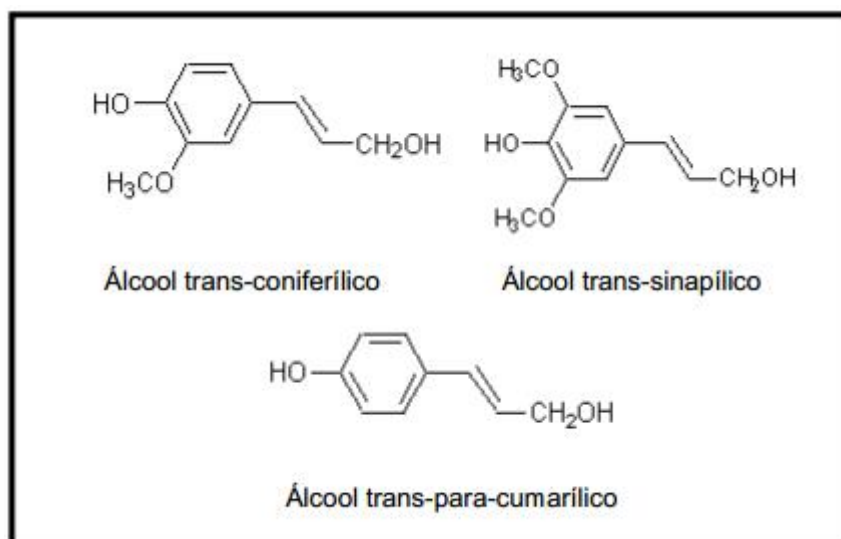


Figura 8: Precursores primários da lignina. Fonte: D'ALMEIDA, 1998

2.6. Hidrólise de resíduos lignocelulósico

A celulose é um dos principais constituintes dos vegetais e é a matéria orgânica mais abundante do mundo. Este material possui um polímero linear com até 15.000 unidades de glicose, que são unidas por ligações glicosídicas β -1,4. A molécula de celulose é arranjada em fibrilas e estão ligadas umas as outras por pontes de hidrogênio e é ligada também à lignina e hemicelulose, isso resulta em uma estrutura rígida e resistente ao ataque enzimático, por isso a degradação da celulose, quando na natureza, é lenta (LIMA; RODRIGUES, 2007).

A produção de etanol por meio de material lignocelulósico, como o caso de resíduos de uva, necessita um tratamento prévio para liberação dos monossacarídeos para que os micro-organismos possam utilizá-los durante a fermentação (TAMANINI; HAULY, 2004).

O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os micro-organismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são pirólise, Explosão a vapor, explosão

de fibra de Amônia, explosão com CO₂ (*Steam explosion, Amomnia fiber explosion, CO₂ explosion*), ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (SUN; CHENG, 2005).

Focando na hidrólise ácida, tem por objetivo romper a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização da hemicelulose no meio ácido, o que promoverá um aumento da digestibilidade da celulose nas etapas posteriores (RABELO, 2010). Podem-se utilizar ácidos concentrados ou diluídos. O ácido sulfúrico é o mais utilizado, por outro lado ácidos como o clorídrico, fosfórico e nítrico vêm sendo estudados (MENON; RAO, 2012). A dificuldade de romper a lignina e a hemicelulose dos resíduos é relacionada com o grau de diluição do ácido utilizado no procedimento. O uso de ácidos concentrados ou com menor grau de diluição rompe com maior facilidade as ligações de lignina e hemicelulose, entretanto resulta em grande quantidade de compostos tóxicos (BAMUFLEH; ALHAMED; DAOUS, 2013).

A hidrólise alcalina é muito utilizada quando tem-se por objetivo quantificar ácidos fenólicos totais, éster e o éter separadamente. Esta hidrólise pode ser feita de duas formas: extração branda, onde a amostra é tratada com solução de hidróxido de sódio 1mol/L, a 20°C por 24 horas, quebrando apenas ligações éster e, extração severa, onde a amostra é tratada com solução de hidróxido de sódio 4mol/L a 170°C por 2 horas e quebra tanto ligações éster, quanto ligações éter (SANTOS, 2009).

A Figura 9 ilustra a quebra da estrutura da matéria lignocelulósica pela influência do pré-tratamento (BALAT, 2010).

Esta separação também pode ser por hidrólise enzimática pelo uso de celulasas como β -endoglucanases, β -exoglucanases ou celobiohidrolases e β -glucosidases. As endoglucanases hidrolisam internamente ligações glicosídicas (ligação β -1,4), atuando sobre celo-oligossacarídeos, celulose contendo ácido fosfórico, celulose substituída como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC); porém não atacam a celobiose. As β -exoglucanases clivam a celulose e celo-oligossacarídeos a partir do terminal redutor e não redutor da cadeia desses polímeros, liberando o dissacarídeo de celobiose. As β -glucosidases hidrolisam a celobiose e outros celo-oligossacarídeos curtos a glicose (LIMA; RODRIGUES, 2007).

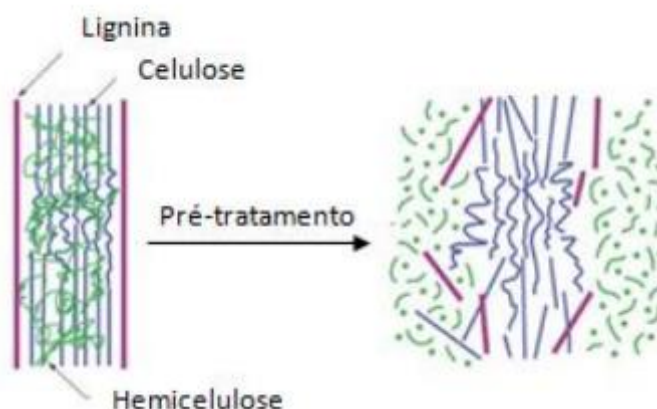


Figura 9 - Estrutura da matéria lignocelulósica antes e após o pré-tratamento Fonte: (BALAT, 2010)

2.7. Micro-organismos produtores de bioetanol

Existem muitos gêneros de micro-organismos produtores de etanol que estão sendo estudados para produzir etanol a partir de resíduos industriais ou matérias-primas de baixo custo, como o bagaço da cana, casca de soja, palha de arroz, resíduos de uvas entre outros. Esses micro-organismos podem ser leveduras do gênero *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen* e *Spathaspora*; fungos filamentosos do gênero *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* e *Paecilomyces*; e bactérias do gênero *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteróides*, *Thermoanaerobacter*, *Klebsiella*, *Cellulomonas* e *Zymomonas* (SILVA, 2007; ERNANDES, 2009; CADETE et al., 2009).

Um exemplo da utilização de resíduos para produção de etanol por micro-organismos é o estudo de Silva (2007), que utilizou *Pichia stipitis* para fermentar hidrolisado de palha de arroz para produção de etanol. Neste trabalho o autor alterou o meio de fermentação e teve aumento de 14% na produtividade. Quando inseriu agitação/aeração nos frascos de fermentação, obteve um aumento de 63% na produtividade e 24% na conversão em etanol.

2.8. *Zymomonas mobilis*

A bactéria *Zymomonas mobilis* é Gram negativa, anaeróbia facultativa e pode se apresentar de forma isolada, em pares ou em cadeias. Sua reprodução é por divisão binária simples (RANZAN, 2010). Esta bactéria é de grande interesse biotecnológico, uma vez que produz vários bioprodutos como etanol, levana, sorbitol, ácido glucônico e fruto-oligossacarídeo (SILBIR et al., 2014).

Esta bactéria utiliza substratos contendo glicose, frutose ou sacarose e os fermenta, tendo como produto principal o etanol chegando a produzir até 97%. Quando o açúcar disponível é a sacarose, seu rendimento de etanol cai para 75-80% e há como subprodutos principais sorbitol e levana (ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2010).

Para produção de etanol o pH varia entre 4,5 e 7 em temperaturas de 30 a 35 °C, entretanto a influência destes dois parâmetros vai depender do tipo de produto que se quer obter. Em temperaturas próximas de 40 °C ocorre redução de crescimento e inibição da produção de etanol (ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2009).

Por ser uma bactéria quimio-organotrófica, além do carboidrato, a *Z. mobilis* precisa de outros nutrientes para seu desenvolvimento, como: nitrogênio (necessário para o “pool” proteico das células e auxilia no crescimento celular); fósforo (utilizado nas vias metabólicas, iniciadas pela fosforilação do substrato e é constituinte das molecular de ATP); enxofre (componente estrutural da célula, é fundamental para formação de proteínas); e outros micronutrientes (RANZAN, 2010).

Torres e Baratti (1988) averiguaram a influência da concentração de substrato inicial para produção de bioetanol a 30 °C com *Z. mobilis*, temperatura esta utilizada para os experimentos deste trabalho. As concentrações testadas por Torres e Baratti foram 100, 120, 140 e 160 mg/mL de glicose somado com frutose inicial. Os autores observaram que a produção de bioetanol reduziu conforme o aumento da concentração de substrato. Com 100 mg/mL de substrato a produção foi de 48,2 mg/mL de bioetanol e para 160 mg/mL a produção caiu para 36,2 mg/mL. Comparando-se o consumo de glicose e frutose para 100 e 160 mg/mL, a redução foi de 7 e 29,7 % de glicose e frutose, respectivamente.

Ferreira (2013) utilizou *Z. mobilis* para produção de bioetanol a partir de hidrolisado de casca de banana. Obteve produção máxima de bioetanol de 87,7 mg/mL, e suas melhores condições foram pH 4,5, 35 °C, 250 mg/mL de teor de sólidos totais em 24 horas de fermentação. Neste mesmo trabalho foi observado que o aumento da produção de bioetanol foi proporcional ao aumento do teor de sólidos totais.

2.9. *Candida tropicalis*

As leveduras são mais utilizadas para produção de bioetanol por serem consideradas melhores produtoras. Destas, a *Sacharomyces cerevisiae* é a mais utilizada por ser resistente ao bioetanol, entretanto leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras, podendo-se citar a *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. mogii*, entre outras espécies deste gênero (CASSALES, 2010).

A *C. tropicalis* é uma levedura diploide asporogênica, que é capaz de consumir diferentes substratos como dissacarídeos, fenóis, alcanos, derivados de alcanos e ácidos graxos. Esta levedura consegue crescer mesmo que haja apenas uma fonte de carbono, tendo altos rendimentos de biomassa. É uma levedura considerada termotolerante e com capacidade de sobreviver, além de continuar um processo fermentativo, em níveis consideráveis de etanol, necessária para produção deste a partir de biomassa lignocelulósica (JAMAI et al., 2001).

Contudo, o bioetanol não é o produto principal produzido por *C. tropicalis* e sim o xilitol. Entretanto quando se alteram algumas condições de fermentação esta deixa de produzir xilitol e passa a produzir bioetanol (OBEROI et al., 2010).

A *C. tropicalis* pode ser utilizada para produção de bioetanol de segunda geração. Para isto, é necessário utilizar hidrólise ácida para que promova a liberação de açúcares fermentescíveis, uma vez que esta levedura metaboliza os compostos liberados na degradação da lignina, os quais podem inibir outros micro-organismos (MARTÍN et al., 2010).

Rattanachomsri et al. (2009), utilizaram hidrolisado enzimático de polpa de mandioca para produção de bioetanol. A produção máxima de etanol foi de 14,3 mg/mL em 30 horas. Utilizaram pH entre 4,5 e 5 incubado a 40 °C, já que a *C. tropicalis* é considerada uma levedura termotolerante.

Martín et al. (2010) verificaram a produção de etanol e xilitol por *C. tropicalis* em podas de oliveira em diversas condições. Quando empregaram pH 5 e 6,5, temperatura de 30 °C e agitação de 500 rpm, ocorreu maior produção de etanol do que de xilitol em 12 horas de processamento.

Além de converter pentoses e hexoses em xilitol e etanol, esta levedura é empregada na biodegradação de fenol ou compostos aromáticos, uma vez que a *C. tropicalis* consegue assimilar estes compostos (VARMA; GAUKWAD, 2009). O fato desta levedura não ser inibida por esses tipos de compostos presentes no hidrolisado ácido, a tornam uma alternativa desejada para produção de etanol em hidrolisados lignocelulósicos, além de não ser necessária a etapa de desintoxicação do hidrolisado (HUANG et al., 2011).

2.10. Consórcio de micro-organismos

O consórcio pode ser feito pela combinação de dois ou mais micro-organismos, sejam estes bactérias, leveduras ou fungos filamentosos (CASSALES, 2010).

Pode-se dizer que para o consórcio são empregadas basicamente duas estratégias: utilização de dois micro-organismos, um responsável pela sacarificação do resíduo e o outro pela síntese do produto em si e pelo processo conhecido como *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF), Sacarificação e Fermentação Simultâneas. Neste, o micro-organismo além de ser capaz de produzir etanol ou outro produto ou subproduto, também é apto a sintetizar celulasas ou estas enzimas podem ser adicionadas ao sistema durante o cultivo (LIMA; RODRIGUES, 2007). O consórcio de micro-organismos tem mostrado maior eficiência quando comparado aos experimentos que utilizam apenas um tipo de micro-organismos (CASSALES, 2010).

Em um estudo realizado por Patle e Lal (2008) o consórcio empregado foi *Z. mobilis* e *C. tropicalis* no hidrolisado do resíduo de thippi (produto com alto teor de amido), eles observaram que, além de produzir maior quantidade de bioetanol, o tempo de fermentação foi menor.

Das et al. (2013) utilizaram hidrolisado enzimático de palha de arroz para fermentação com *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. A maior produção de bioetanol foi de

41,1 mg/mL em pH 6 e temperatura de 30 °C. Os autores concluíram que o emprego deste consórcio pode ser uma alternativa apropriada para suprir a demanda de biocombustíveis e redução de resíduos descartados ao meio ambiente.

Hickert et al. (2013) empregaram o consórcio com *S. cerevisiae* e *C. shehatae* no hidrolisado ácido de casca de arroz. Observaram que com o consórcio houve maior bioconversão de hexoses e pentoses (glicose e xilose, respectivamente) em bioetanol. Para o trabalho de Singh, Majumder e Ghosh (2014) o controle de oxigênio para o consórcio de *Z. mobilis* e *Pichia stipitis* favoreceu a produção máxima de bioetanol no hidrolisado ácido de biomassa de grama.

Silva (2014) estudou a produção de etanol a partir do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por fermentação pelo consórcio formado por *Pachysolen tannophilus* e *Zymomonas mobilis*. O consórcio obteve 42 mg/mL de etanol nas condições de pH 6,5 com 15% m/v do hidrolisado desintoxicado no tempo de 6 h, a 30 °C, com produtividade de 5,4 g/L.h⁻¹. Mostrando assim, ter potencial para obter maior produção de etanol em pouco tempo de fermentação.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Determinar a produção de bioetanol de segunda geração, pela fermentação de resíduos de uvas das espécies Isabel e Bordô, engaço (sustentação do cacho de uva) e mistura (bagaço fermentado e engaço), hidrolisados com ácido sulfúrico, pelo consórcio da bactéria *Zymomonas mobilis* e da levedura *Candida tropicalis*.

3.2. Específicos

- ✓ Hidrolisar os resíduos de uva, bagaço e engaço, com ácido sulfúrico para liberação dos açúcares fermentescíveis;
- ✓ Determinar a concentração da solução ácida e tempo para a hidrólise dos resíduos de uva;
- ✓ Realizar fermentações com cada micro-organismo utilizando o hidrolisado ácido da mistura de 50% do bagaço fermentado com 50% do engaço, o hidrolisado ácido do engaço e meio semi-sintético como substrato para produção de bioetanol, acompanhando variação de pH e crescimento da biomassa;
- ✓ Realizar fermentações com o consórcio dos micro-organismos em cada resíduo separadamente acompanhando variação de pH e crescimento da biomassa;
- ✓ Avaliar a produção de bioetanol por cromatografia gasosa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Biopolímeros, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP- Campus de São José do Rio Preto/SP.

4.1. Resíduos de uva

Os resíduos de uva foram fornecidos pela Vinícola do Seu Santin, localizada na cidade de Jales-SP. Fazem parte destes resíduos o engaço, que é formado pela armação do cacho da uva que suporta o fruto e o bagaço, que é constituído pela película, as sementes e os restos da polpa da uva, resultantes do esmagamento da fruta no processo de separação do suco ou mosto utilizados na fermentação para produção de vinho.

Foi utilizada a quantidade específica de engaço e mistura (50% engaço e 50% bagaço) da uva e foi homogeneizado o tamanho de partícula e a umidade.

4.2. Hidrólise dos resíduos de uva

4.2.1. Padronização da hidrólise

Foram testadas hidrólises nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0% (v/v) de ácido sulfúrico, em duplicata. Para isto, pesou-se 5,0 g do engaço previamente seco e triturado, em Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 25 mL da respectiva solução ácida. Pesou-se também 5,0 g da mistura (2,5g de engaço juntamente com 2,5g do bagaço) previamente secos e triturados, em Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 25 mL da respectiva solução ácida. Os hidrolisados foram tratados com aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm² nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. O tempo médio de aquecimento da autoclave e de

voltar à pressão aos níveis normais foi de 10 minutos. Após, os Erlenmeyers foram deixados por 20 minutos em temperatura ambiente até resfriamento fora da autoclave, e ajustou-se o pH para 6 com hidróxido de sódio 50% (m/m). Cada hidrolisado foi centrifugado a 3600 rpm por 20 minutos, para separação do bagaço e engaço remanescentes. Após centrifugação, filtrou-se o hidrolisado em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção completa do bagaço e engaço da uva.

Todos os filtrados foram armazenados em frasco com tampa em torno de 0°C. Em cada hidrolisado foram determinados açúcares totais (DUBOIS et al., 1956) e açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952).

A padronização foi determinada considerando em qual concentração mínima de ácido extraiu-se quantidade de açúcares satisfatória em condições da autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm², considerando que, mesmo em uma concentração alta de ácido, pode-se extrair mais açúcares, ou em uma concentração baixa de ácido, pode-se extrair menos, essa diferença entre a máxima e a mínima extração pode não ser significativa, optando assim, pelo processo que utilizou menos tempo, menos reagente e liberação de açúcares satisfatória.

4.3. Micro-organismos e meios de cultura

4.3.1. *Zymomonas mobilis*

A cultura da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo.

4.3.1.1. Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação

O meio utilizado para armazenamento da bactéria foi chamado ágar *Zymomonas mobilis* (AZM). Este meio foi composto por (g/L): peptona, 10; extrato de levedura, 10; glicose, 20; e ágar, 15. As células foram armazenadas na temperatura

de 4 °C. O meio utilizado para enriquecimento da bactéria foi o chamado caldo *Zymomonas mobilis* (CZM). Este meio contém os mesmos reagentes que o AZM, exceto ágar, obtendo assim um meio líquido (caldo). Este meio foi adicionado de glicose e hidrolisado ácido. Os meios de cultura foram chamados de semi-sintético, com hidrolisado ácido.

4.3.1.2. Meio de fermentação

O meio utilizado para fermentação da bactéria foi constituído por (g/L): MgSO_4 , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; KH_2PO_4 , 1; Extrato de levedura, 5, proposto por Rodriguez e Callieri (1986) com modificações.

4.3.1.3. Preparo do pré-inóculo

A cepa de *Zymomonas mobilis* CCT4494 foi repicada em tubos com CZM e incubada a 30 °C por 24 horas (MORO, 2012).

4.3.1.4. Pré-fermentação

Após 24 horas de pré-inóculo, 10 tubos com a cultura crescida foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de CZM, incubados em shaker orbital com controle de temperatura a 30 °C sem agitação, por 24 horas. Posteriormente a massa celular foi centrifugada e resuspendida em água destilada esterilizada para homogeneização do inóculo (MORO, 2012).

4.3.2. *Candida tropicalis*

A levedura *C. tropicalis* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo.

4.3.2.1. Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação

O meio utilizado para armazenamento da levedura foi chamado de ágar *Candida tropicalis* (ACT). Este meio foi composto por (g/l): extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona, 5; xilose, 10; e ágar, 20. As células foram armazenadas na temperatura de 4 °C. O meio utilizado para enriquecimento da levedura foi chamado de caldo *Candida tropicalis* (CCT). Este meio contém os mesmos reagentes que o ACT, exceto ágar, obtendo-se um caldo.

O meio utilizado para fermentação da levedura foi constituído por (g/L): MgSO_4 , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; KH_2PO_4 , 1; Extrato de levedura, 5, proposto por Patle e Lal (2008), com modificações. Este meio foi adicionado de xilose e hidrolisado ácido. Os meios de cultura foram chamados de semi-sintético e hidrolisado ácido.

4.4. Fermentações com hidrolisados ácidos

4.4.1. Experimento I – Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas (50 % engaço e 50 % bagaço fermentado) como substrato para a bactéria *Zymomonas mobilis*

As variáveis utilizadas para *Z. mobilis* foram baseadas em trabalhos realizados com o mesmo micro-organismo (ERNANDES, 2009; MORO, 2012; FERREIRA, 2013). Assim as condições foram: temperatura de 30 °C; concentração de substrato de 5 % (m/v); pH 6; sem agitação e tempo de incubação de 12, 24, 36 e 48 horas, para conhecer o comportamento da bactéria. Todas as amostras foram incubadas em estufa DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Após cada tempo de fermentação, determinou-se a absorbância (570 nm) (ERNANDES, 2009; MORO, 2012; FERREIRA, 2013), para verificar crescimento celular e, também, determinou-se o pH. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 minutos para separar as células do meio, e separar uma alíquota para análise de etanol por cromatografia gasosa (ítem 4.6.2.).

4.4.1.1. Padronização do inóculo

Para padronizar o inóculo utilizou-se o meio CZM para o crescimento da bactéria. Este procedimento foi realizado com intervalo de 24 horas e incubação a 30 °C. Primeiro, inoculou-se a bactéria em 5 tubos de ensaio contendo 5 mL de CZM cada. A seguir os tubos foram vertidos em um Erlenmeyer com 75 mL de CZM e, por último, todo o conteúdo do Erlenmeyer foi passado para outro com 150 mL de CZM. Posteriormente a essas etapas, contrifugou-se o caldo do último erlenmeyer por 15 minutos a 3600 rpm e 25 °C, a fim de separar as células do CZM. O caldo foi desprezado, então adicionou-se água destilada esterilizada para lavagem do “pellet” de células e retirada de qualquer resíduo do CZM, e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada.

O “pellet” de células bacterianas foi ressuspendido com água destilada esterilizada e fizeram-se diluições que, por sua vez, foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

Posteriormente, em uma cubeta de espectrofotômetro contendo 3 mL de água destilada, gotejou-se a suspensão contendo bactéria (média desejada de 0,15 mL) até atingir absorbância de 0,300 (570 nm). Por meio de uma regra de três, foi quantificado o peso inicial da bactéria em cada Erlenmeyer para fermentação. Cálculo:

$\frac{3 \text{ mL}}{y} = \frac{x}{z}$
--

(Equação 1)

Onde:

x = volume utilizado de suspensão na cubeta;

y = volume final de meio da fermentação;

z = volume de suspensão com a bactéria utilizada para fermentação.

4.4.2. Experimento II – Fermentação com a utilização do hidrolisado ácido do engaço de uva como substrato pela bactéria *Zymomonas mobilis*

As variáveis utilizadas para *Z. mobilis* estão descritas no item 4.4.1 com a alteração de que o tempo de incubação foi de 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas para verificar o comportamento da bactéria para com o hidrolisado ácido do engaço e avaliar a produção de etanol neste período.

A padronização do inóculo está descrita no item 4.4.1.1.

4.4.3. Experimento III – Fermentação com a utilização do hidrolisado ácido do engaço de como substrato pela levedura *Candida tropicalis*

As condições utilizadas para a levedura *Candida tropicalis* foram: temperatura de 30 °C; concentração de substrato de 5 % (50 g/L) por evaporação em banho-maria até que concentração desejada fosse atingida (°Brix); pH 6; sem agitação e tempo de incubação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Estes permitiram determinar o comportamento da levedura no hidrolisado ácido, pois foi o primeiro experimento com este micro-organismo com este substrato nestas condições. Todas as amostras foram incubadas em estufa D.B.O. Após cada tempo de fermentação, determinou-se a absorbância (570 nm), para verificar crescimento celular e determinou-se também o pH. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 minutos para separar as células do meio além disso, uma alíquota foi retirada para análise de etanol por cromatografia gasosa (item 4.6.2.).

4.4.3.1. Padronização do inóculo

Para padronizar o inóculo utilizou-se o meio CCT para o crescimento da levedura. Este procedimento foi realizado em intervalo de 24 horas e incubação a 30 °C a 220 rpm. Primeiro, inoculou-se a levedura em 5 tubos de ensaio contendo 5 mL de CCT cada. A seguir os tubos foram vertidos em um Erlenmeyer com 75 mL de CCT e, por último, todo o conteúdo do Erlenmeyer foi passado para outro com 150 mL de CCT. Posteriormente a essas etapas, centrifugou-se o caldo do último

Erlenmeyer por 15 minutos a 3600 rpm e 25 °C, a fim de separar as células do CCT. O caldo foi desprezado, então adicionou-se água destilada esterilizada para lavagem do “pellet” de células e retirada de qualquer resíduo do CCT, e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada.

O “pellet” de células foi ressuspenso com água destilada esterilizada e fizeram-se diluições que, por sua vez, foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

Posteriormente, em uma cubeta de espectrofotômetro contendo 3 mL de água destilada, gotejou-se a suspensão contendo a levedura (média desejada de 0,15 mL) até atingir absorvância de 0,300 (570 nm). Por meio de uma regra de três, foi quantificado o peso inicial da levedura em cada erlenmeyer para fermentação. Cálculo:

$\frac{3 \text{ mL}}{y} = \frac{x}{z}$
--

(Equação 1)

Onde:

x = volume utilizado de suspensão na cubeta;

y = volume final de meio da fermentação;

z = volume de suspensão com a bactéria utilizada para fermentação.

4.4.4. Experimento IV – Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas (50 % engaço e 50 % bagaço fermentado) como substrato pela levedura *Candida tropicalis*

As condições utilizadas para *C. tropicalis* estão descritas no item 4.4.3, no entanto, o tempo de incubação foi de 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas, pois no experimento III a primeira alíquota foi retirada em 24 horas de fermentação, e como a Figura 25 (pág. 66) mostra, a produção de etanol deste tempo em diante apresentou-se decrescente, assim houve a necessidade de investigar a produção de etanol antes deste período.

A padronização do inóculo está descrita no item 4.4.3.1.

4.4.5. Experimento V - Fermentação utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uvas como substrato pelo consórcio de micro-organismos

As variáveis utilizadas para *Z. mobilis* estão descritas no item 4.4.1 e para *C. tropicalis* estão descritas no item 4.4.3 com tempo de incubação de 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas. As fermentações com os micro-organismos separados aconteceram nestas condições (padronização dos experimentos).

As padronizações dos inóculos estão descritas nos itens 4.4.1.1. para a *Z. mobilis* e 4.4.3.1. para a *C. tropicalis*.

4.5. Fermentações em meios semi-sintéticos

4.5.1. *Zymomonas mobilis* em meio semi-sintético

Neste experimento o meio semi-sintético foi composto pela glicose como substrato, na concentração de 50g/L.

As variáveis utilizadas para *Z. mobilis* estão descritas no item 4.4.1 com o tempo de incubação para 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas e a padronização do inóculo está descrita no item 4.4.1.1.

4.5.2. *Candida tropicalis* em meio semi-sintético

Neste experimento o meio semi-sintético foi composto pela xilose como substrato, na concentração de 50g/L.

As condições utilizadas para *C. tropicalis* estão descritas no item 4.4.3, no entanto, o tempo de incubação foi de 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas e a padronização do inóculo está descrita no item 4.4.3.1.

4.5.3. Consórcio em meio semi-sintético

Neste experimento o meio semi-sintético foi composto pela glicose como substrato, na concentração de 50g/L.

As variáveis utilizadas para *Z. mobilis* estão descritas no item 4.4.1 e para *C. tropicalis* estão descritas no item 4.4.3, o tempo de incubação para 8 horas com retirada de alíquotas de 2 em 2 horas.

As padronizações dos inóculos estão descritas nos itens 4.4.1.1. para a *Z. mobilis* e 4.4.3.1. para a *C. tropicalis*.

4.6. Métodos analíticos

4.6.1. Determinação de açúcares redutores (AR)

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL do reagente de Somogyi e deixou-se em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,5 mL do reagente de Nelson e 3,5 mL de água destilada e determina-se a concentração a 540 nm em espectrofotômetro (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952).

4.6.2. Determinação de etanol por cromatografia gasosa

O etanol produzido foi determinado por cromatografia gasosa pelo equipamento *Thermo Scientific* serie 367B08 modelo 260W298P equipado de coluna TR-WAX e detector de ionização de chama. Este é um método físico de separação no qual os componentes são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária, e a fase móvel. A temperatura do injetor é mantida a 230°C e a do detector a 270°C. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40°C, a qual foi aumentada a

uma velocidade de 20°C por minuto até atingir temperatura final de 100°C. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio, em taxa split de 1:20 e tempo de corrida de 5 minutos. A amostra do “headspace” (50µL) foi retirada por meio de seringa própria para gases.

4.6.3. Determinação do pH

O pH foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria utilizando o pHmetro Digimed modelo DM20.

4.6.4. Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi monitorada através da absorbância no espectrofotômetro Libra 5 UV-VIS “*Double Beam*” de suspensões diluídas do meio de fermentação, num comprimento de onda de 570 nm para os dois micro-organismos. A conversão da suspensão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) foi obtida através da curva de calibração da concentração celular de suspensões de *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da hidrólise dos resíduos de uva

Os resíduos de uva fornecidos pela Vinícola do Seu Santin, localizada na cidade de Jales-SP, foram secos ao sol, moídos e o tamanho das partículas utilizadas foi homogeneizado por meio de peneiras até atingir o tamanho $\leq$ que 0,84 mm.

Primeiramente as hidrólises aconteceram no tempo de 5 minutos em todas as concentrações de ácido sulfúrico testadas (item 4.2.1.). Os resultados da quantificação de açúcares redutores e totais estão mostrados nas Figuras 10 e 11.

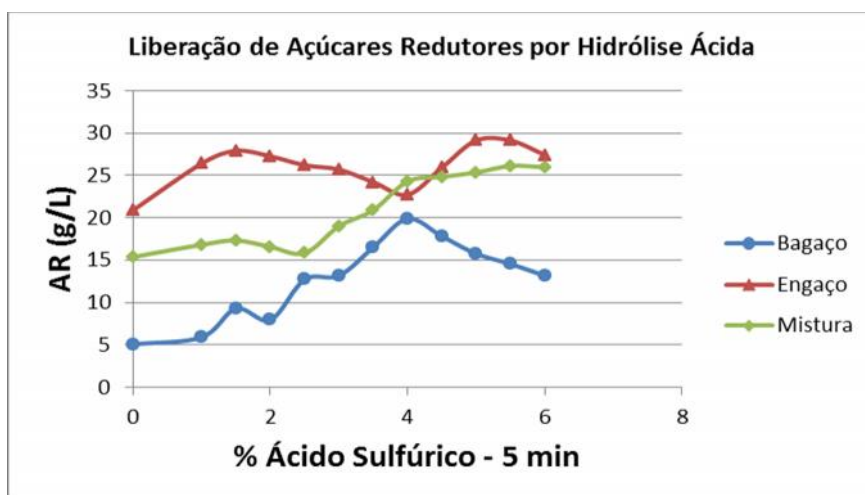


Figura 10: Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 5 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

Observa-se que o bagaço foi o resíduo que liberou menor quantidade de açúcares por este tratamento. Por outro lado, o engaço é o que mais apresentou açúcares redutores após análise pelo método proposto por Nelson (1944) e Somogyi (1952). A mistura, de 1:1 dos resíduos, apresentou liberação intermediária de açúcares quando comparada aos outros dois.

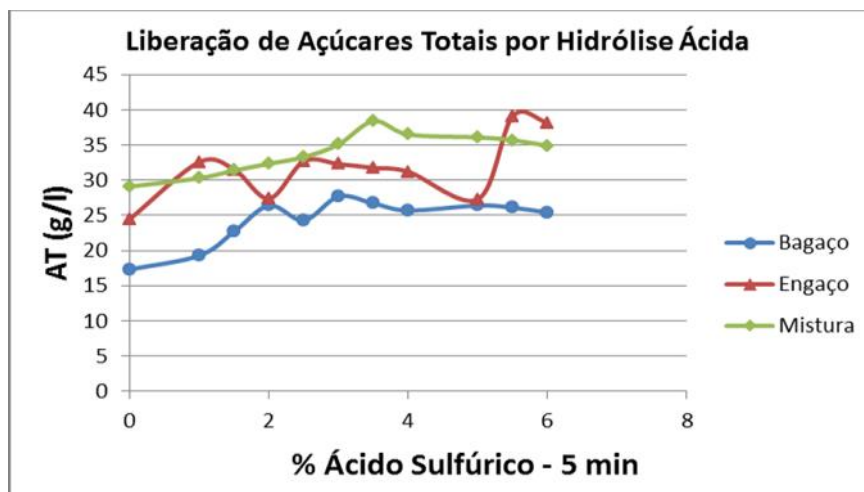


Figura 11: Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 5 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

A análise de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956), mostra que o bagaço continua sendo o resíduo que, no pré-tratamento para liberação de açúcares, forneceu a menor quantidade do substrato para possível conversão em etanol. Por outro lado, o engaço, nas mesmas concentrações de ácido sulfúrico que liberou maior quantidade de açúcar; já a mistura dos resíduos (1:1) disponibilizou, praticamente, a mesma quantidade de açúcar, em menor concentração de ácido (Figura 11).

De acordo com os resultados obtidos pela hidrólise ácida por 5 minutos de aquecimento, optou-se por utilizar as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0% em um novo tratamento com 10 minutos de aquecimento. Estas concentrações foram as que liberaram melhores quantidades de açúcares dos resíduos de uva. Mesmo sendo observado que concentrações maiores de ácido sulfúrico liberou mais açúcares do que as de 1,0; 1,5 e 2,0%. Estes valores foram selecionados para os experimentos posteriores, pelo fato de serem menores e a produção de açúcares serem parecidas. Os resultados das hidrólises por 10 minutos, variando estas concentrações de ácido sulfúrico, e a quantidade de açúcares redutores e totais estão apresentadas Figuras 12 e 13.

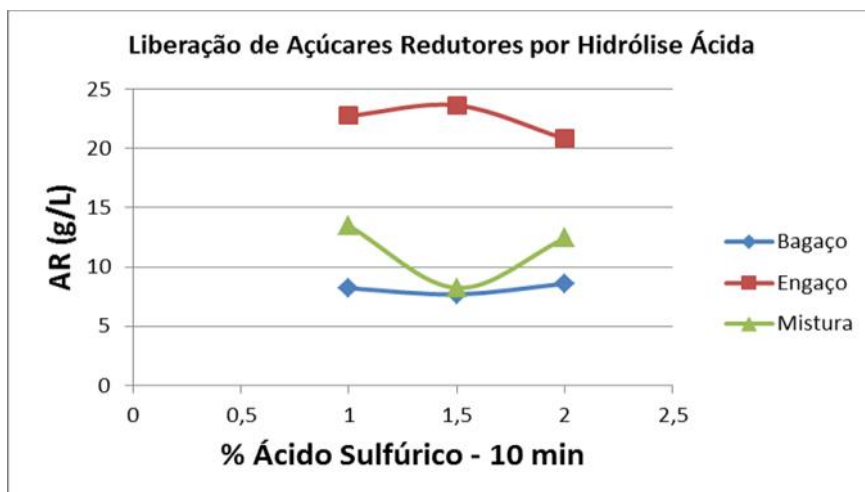


Figura 12: Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 10 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

A Figura 12 mostra que o engaço foi o resíduo que mais liberou açúcares fermentescíveis quando comparado com os outros resíduos. A mistura (1:1) e bagaço, nas mesmas condições de tratamento, liberaram quantidades próximas destes. Portanto, foram realizados novos tratamentos com as mesmas concentrações de ácido sulfúrico, porém com 15 minutos de aquecimento.

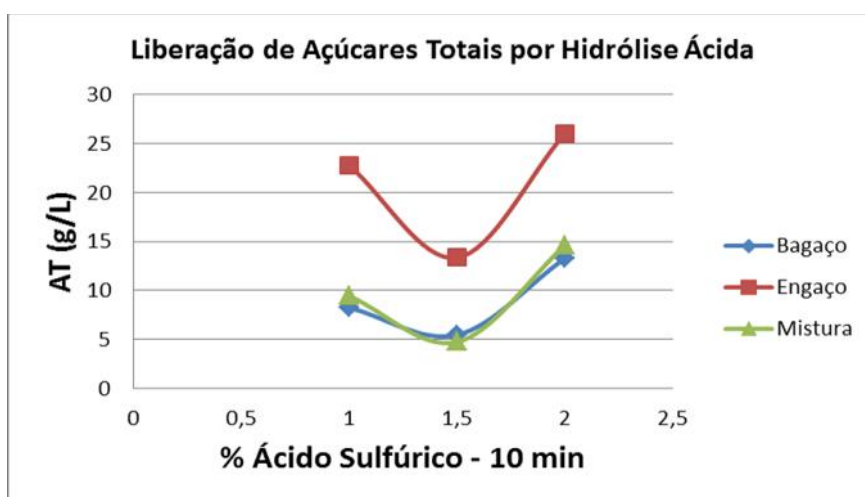


Figura 13: Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 10 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

A Figura 13 mostra um comportamento semelhante ao observado na Figura 12 para a análise de açúcares totais.

As Figuras 14 e 15 mostram o pré-tratamento ácido durante 15 minutos de aquecimento em autoclave. O engaço foi o resíduo que liberou mais açúcares quando comparado com os outros dois resíduos em, praticamente, todas as concentrações do ácido nos três tempos de tratamento. No entanto liberação de açúcares durante 5 minutos de aquecimento foi a mais eficiente, mesmo sendo menos tempo.

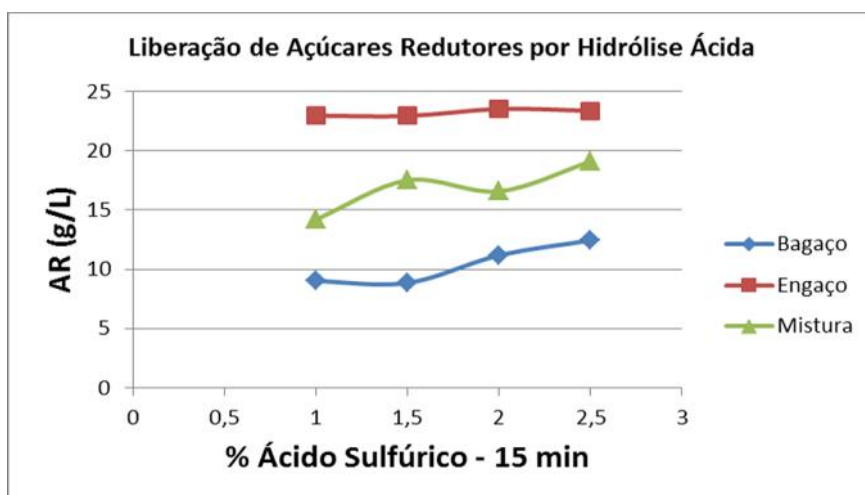


Figura 14: Liberação de açúcares redutores por hidrólise ácida por 15 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

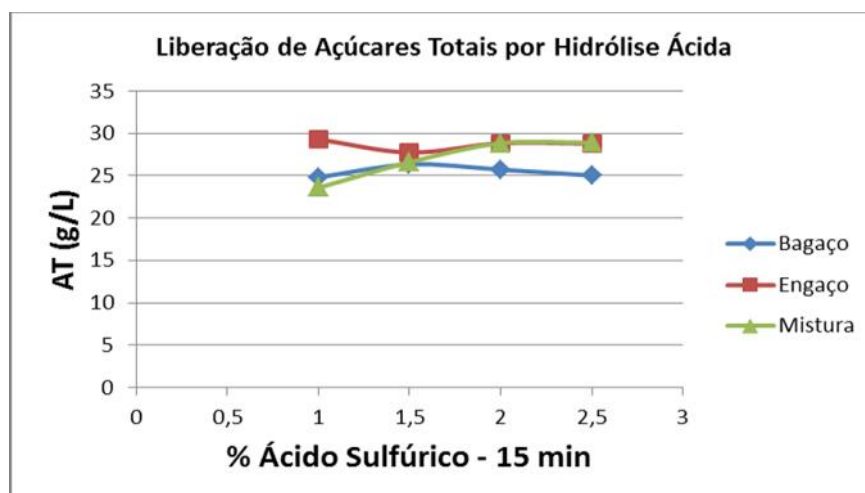


Figura 15: Liberação de açúcares totais por hidrólise ácida por 15 minutos e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm²

De acordo com as hidrólises apresentadas nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15, comparando todos os processos, foram selecionadas as condições: 1,5 % de concentração de ácido sulfúrico, durante 5 minutos de hidrólise e aquecimento em autoclave a 121 °C e 1 kgf/cm². Estas condições foram satisfatórias para disponibilizar os açúcares fermentescíveis e foram utilizadas para padronizar todos os experimentos.

Esta concentração foi escolhida pelo fato de que o uso de concentrações mais baixas de ácido sulfúrico reduz o risco de corrosão dos fermentadores, além de reduzir custos pela menor quantidade a ser utilizada deste reagente. A temperatura foi mantida constante, entretanto, o tempo escolhido foi o menor, uma vez que diminuem os gastos com energia, tornando o processo com menor custo (TOMÁZ-PEJÓ et al., 2011).

Cara et al. (2008) utilizaram ácido sulfúrico nas concentrações de 0,2; 0,6; 1,0 e 1,4 % e temperaturas de 170, 180, 190, 200 e 210 °C, todos com 1 minuto de duração, em resíduos de oliveira. Estes pesquisadores observaram que a maior quantidade de açúcares totais liberados foi de 24,3 g/100g de resíduos a 170 °C e 1,0 % de ácido sulfúrico. Eles também observaram que conforme a temperatura aumentava, a liberação destes açúcares diminuía. Esta diferença entre os trabalhos pode ser devida tanto a resíduo quanto à temperatura utilizada (HUANG et al., 2011).

Noronha et al. (2010) realizaram um estudo utilizando ácido sulfúrico concentrado em bagaço de cana de açúcar com aquecimento a 121 °C por 10 minutos, os resultados obtidos foram semelhantes aos do trabalho de Scordia et al. (2012). Isto é, liberaram maiores quantidades de xilose (15,76 g/L) do que glicose (1,34 g/L). No presente trabalho a liberação de açúcares redutores foi de 23,6 g/L no engaço de uva utilizando 1,5 % de ácido sulfúrico e 10 minutos de aquecimento em autoclave a 121 °C. No entanto, com 5 minutos de aquecimento, nas mesmas condições, a liberação de açúcares fermentescíveis foi de 27,91 g/L no mesmo resíduo.

5.2. Fermentações com hidrolisados ácidos

5.2.1. Experimento I: *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva

Neste experimento foram realizados testes com o meio de cultura contendo o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva (50 % engaço *in natura* com 50% bagaço fermentado). As condições testadas foram 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de 5 % (m/v); e foram retiradas alíquotas nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas de fermentação.

A variação do pH foi de 6,0 a 5,55 durante a fermentação (Figura 16).

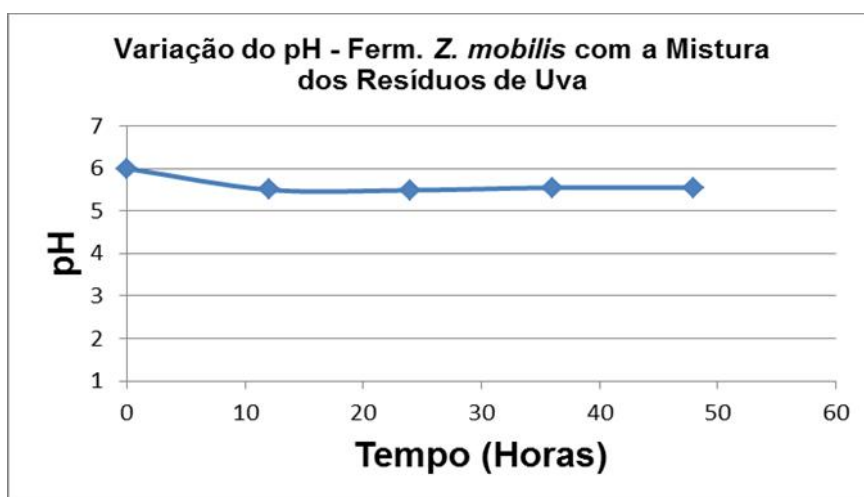


Figura 16: Variação do pH da fermentação realizada pela bactéria *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas incubado a 30 °C

Na Figura 16, observa-se que houve pouca variação do pH no decorrer da fermentação. Esta pequena alteração do pH, pode ser um reflexo do crescimento celular que é mostrado na Figura 17.

5.2.1.1. Crescimento celular

O crescimento celular (biomassa) foi determinado no decorrer do experimento utilizando a leitura da absorbância por espectrofotometria (570 nm). Esta determinação é importante para verificar a influência dos diferentes meios de cultura, nos diferentes substratos para com os micro-organismos utilizados, refletindo, ou não, na produção de bioetanol.

A Figura 17 mostra o crescimento da biomassa durante o processo fermentativo, nesta pode-se observar que nas 12 primeiras horas de fermentação foi atingido o maior crescimento, que se torna praticamente constante durante todo o período fermentativo.

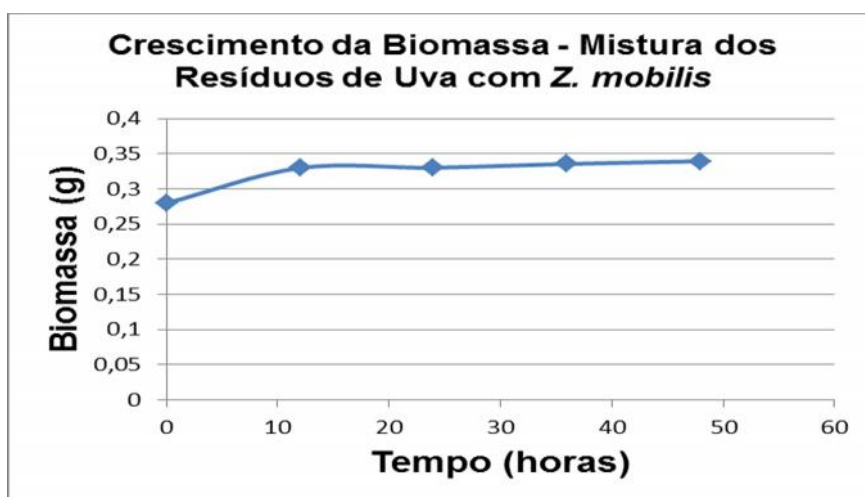


Figura 17: Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela bactéria *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempo de 12, 24, 36 e 48 horas incubado a 30 °C

5.2.1.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

As amostras foram analisadas no cromatógrafo de gases, mas, não foi detectado etanol.

No estudo de Letti et al. (2012), utilizando melaço de soja, produziram-se 24,2 g/l de bioetanol com *Z. mobilis*. As condições testadas foram pH 6, temperatura 30

°C e concentração de açúcares totais de 15 %, o triplo do utilizado no presente trabalho (5 %). Mazaheri et al. (2012) utilizaram vagem de alfarroba, sem hidrólise, para produção de bioetanol com esta mesma bactéria. A produção máxima foi de 15,9 g/l em 5 % de açúcares totais a 31°C em 43 horas.

5.2.2. Experimento II: *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido do engaço dos resíduos de uva

Neste experimento foram realizados testes com o hidrolisado ácido do engaço de uva. As condições testadas foram 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de 5 % (m/v); e foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação, assim como nos outros experimentos do presente trabalho.

A variação do pH foi de 6,0 a 5,65 durante a fermentação (Figura 18).

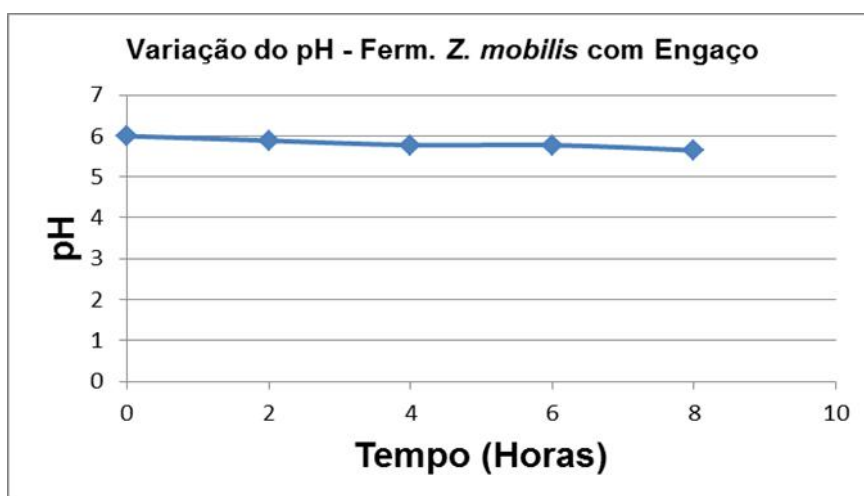


Figura 18: Variação do pH durante a fermentação realizada pela bactéria *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

Na Figura 18, observa-se que a variação do pH no decorrer da fermentação foi de 6 até 5,65, uma alteração pequena. Sendo que, é importante ressaltar que neste experimento não foi detectado etanol por cromatografia gasosa. A redução do pH em processos fermentativos é decorrente da produção de ácidos orgânicos, como láctico, acético e succínico, neste experimento, estes compostos, não foram

realizadas análises para esta verificação.

5.2.2.1. Crescimento celular

Durante a leitura da absorbância (570 nm) para determinação do crescimento celular da bactéria *Zymomonas mobilis* na fermentação utilizando o hidrolisado ácido do engaço, observou-se que o micro-organismo conseguiu desenvolver-se melhor quando comparado com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva. Mesmo assim, não foi detectada a produção de etanol por esta bactéria, neste meio de cultura e nestas condições.

A Figura 19 mostra o crescimento da biomassa durante o processo fermentativo pode-se observar que nas 2 primeiras horas de fermentação, houve crescimento, e após este tempo manteve-se praticamente constante. Na fermentação descontínua, a produção de bioetanol esta associada ao crescimento celular, uma vez que a formação eficiente do produto ocorre somente durante uma parte do ciclo de fermentação, o que promove uma produtividade menor do que a obtida por processos que consigam prolongar este período (contínuos).

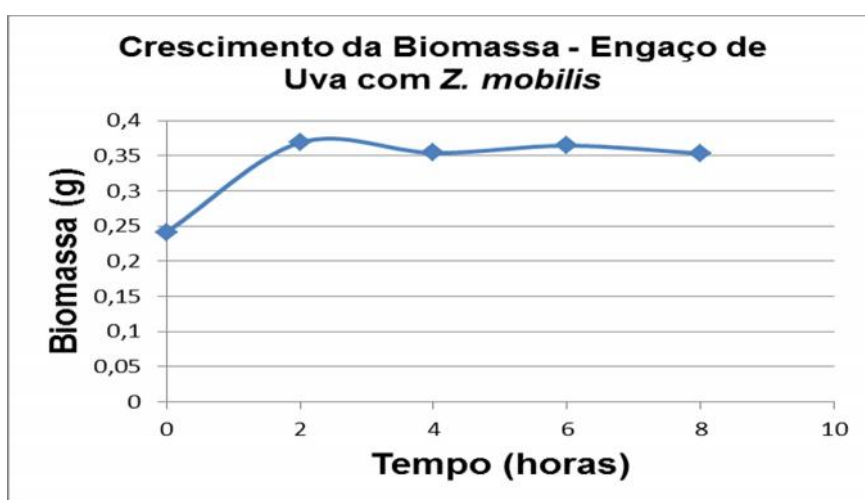


Figura 19: Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela bactéria *Zymomonas mobilis* com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.2.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

Neste experimento não foi detectada a produção de etanol por cromatografia gasosa. Portanto, as condições utilizadas neste experimento, temperatura 30 °C, pH 6, concentração de substrato de 5 %, não foram boas para que a bactéria *Zymomonas mobilis* produzisse etanol.

5.2.3. Experimento III: *Candida tropicalis* com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva

Neste experimento foram realizados testes com o meio de cultura contendo o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva (50% engaço e 50% bagaço fermentado). As condições testadas foram 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de 5 % (m/v); e foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação.

A variação do pH no decorrer da fermentação é mostrada na Figura 20.

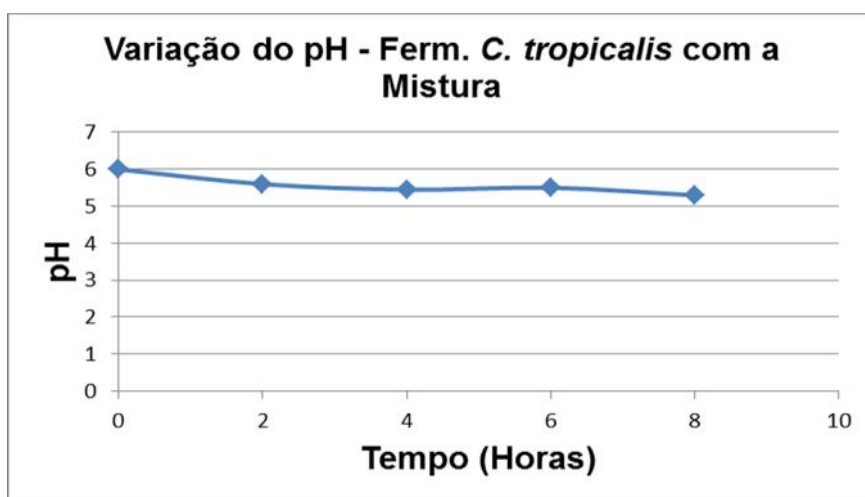


Figura 20: Variação do pH durante a fermentação realizada pela levedura *Candida tropicalis* no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

Durante este experimento o pH inicial foi 6 e, após 8 horas de fermentação diminuiu para 5,3. O pH mais próximo da neutralidade, pode gerar alguma inibição dos micro-organismos no consumo do substrato, fazendo com que aumente a fase de adaptação da levedura ao meio. Pode ser que esta pequena variação tenha tido este efeito no presente experimento.

5.2.3.1. Crescimento celular

A Figura 21 mostra o crescimento da biomassa da levedura *Candida tropicalis* durante o processo fermentativo utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva como substrato. Observa-se que em 4 horas de fermentação houve o maior crescimento, com 0,22 g e após este período o crescimento apresenta ligeiro aumento durante todo o processo fermentativo.

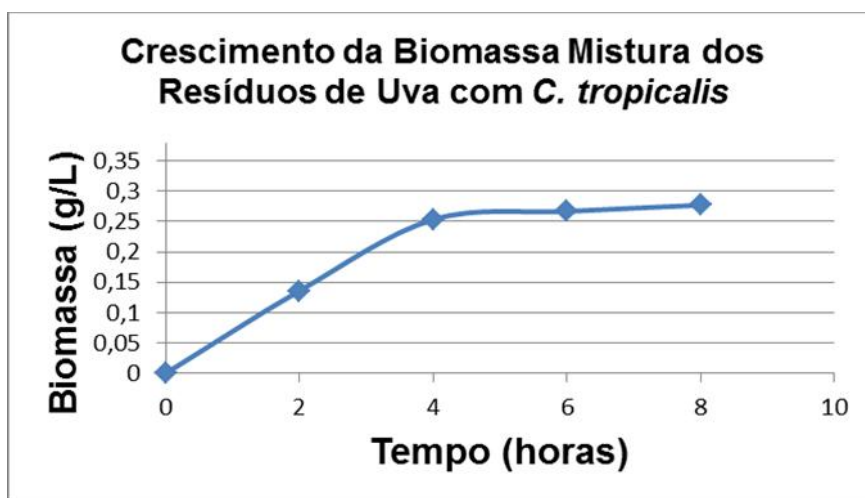


Figura 21: Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela levedura *Candida tropicalis* com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.3.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

A Figura 22 mostra a produção de etanol, em g/L, realizada pela levedura *C. tropicalis* utilizando como substrato a mistura dos resíduos de uva. Nesta observa-se

que a maior produção de etanol foi de 1,04 g/L, em 6 horas de fermentação, após este tempo, pode se observar a diminuição da produção. Comparando as Figuras 21 e 22 pode-se considerar que a produção de etanol ocorre logo após o crescimento pronunciado (4h), que dizer que a levedura produziu etanol assim que terminou a fase de reprodução. Entretanto, após 6 horas ocorreu o declínio da produção, provavelmente pela escassez de nutrientes.

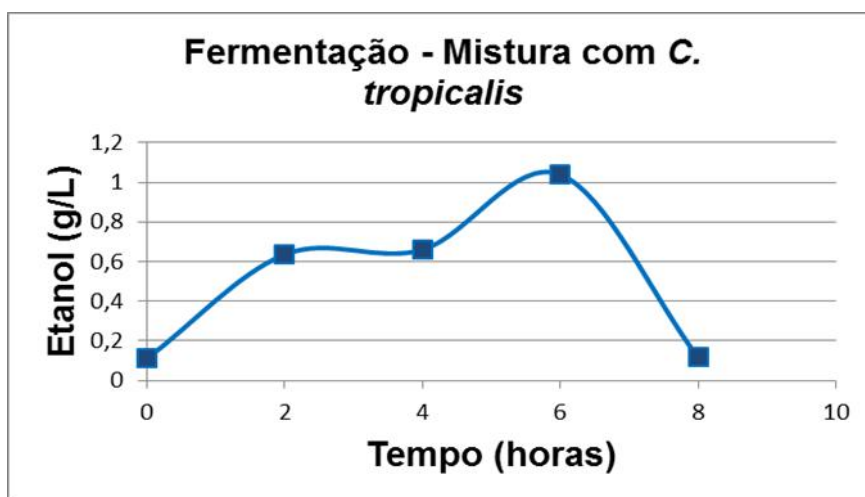


Figura 22: Produção de etanol pela levedura *Candida tropicalis* no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.4. Experimento IV: *Candida tropicalis* com o hidrolisado ácido do engaço de uva

Neste experimento foram realizados testes com o meio de cultura contendo o hidrolisado ácido do engaço de uva. As condições testadas foram 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de 5 % (m/v); e foram tiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação.

A variação do pH no decorrer da fermentação é mostrada na Figura 23.

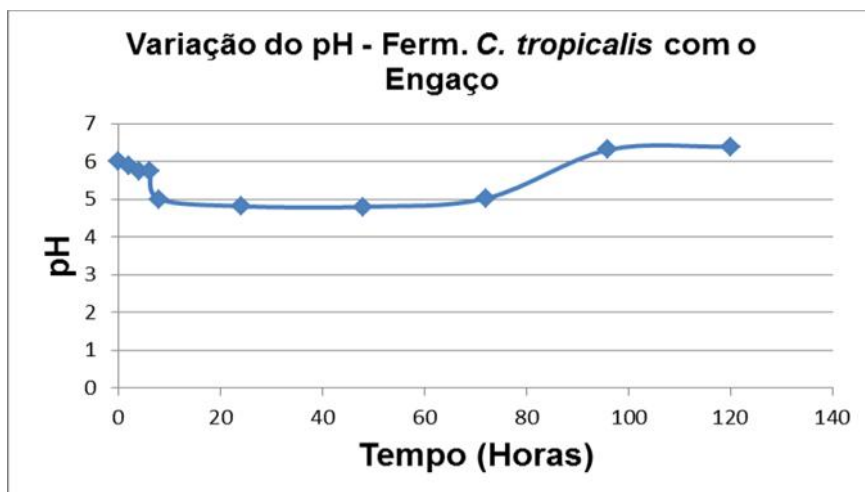


Figura 23: Variação do pH durante a fermentação realizada pela levedura *Candida tropicalis* no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

Nesta Figura 23 observa-se que o processo de fermentação deu início com pH 6 e depois diminuiu e se manteve constante. Entretanto, a partir das 48 horas, nota-se seu aumento, caracterizando que outros compostos podem ter sido formados e não apenas o etanol.

5.2.4.1. Crescimento celular

A Figura 24 mostra o crescimento da biomassa durante o processo fermentativo utilizando o hidrolisado ácido do engaço de uva com a levedura *Candida tropicalis*. Observa-se que, até 8 horas de fermentação, o crescimento celular foi rápido e, aparentemente, a levedura se encontra na fase log, e após, ele foi mais pausado e se manteve praticamente constante até o final do processo fermentativo.

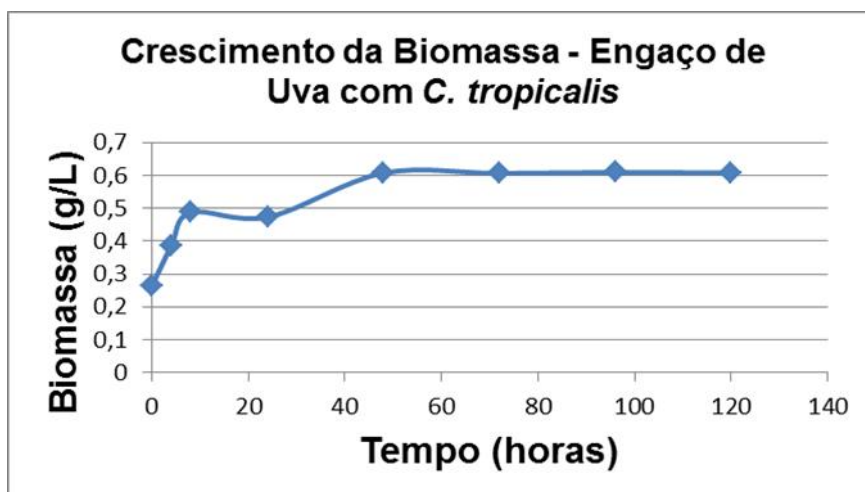


Figura 24: Crescimento da biomassa durante a fermentação realizada pela levedura *Candida tropicalis* com o hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.4.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

A Figura 25 mostra a produção de etanol, em g/L, realizada pela *C. tropicalis* utilizando como substrato o engaço de uva.

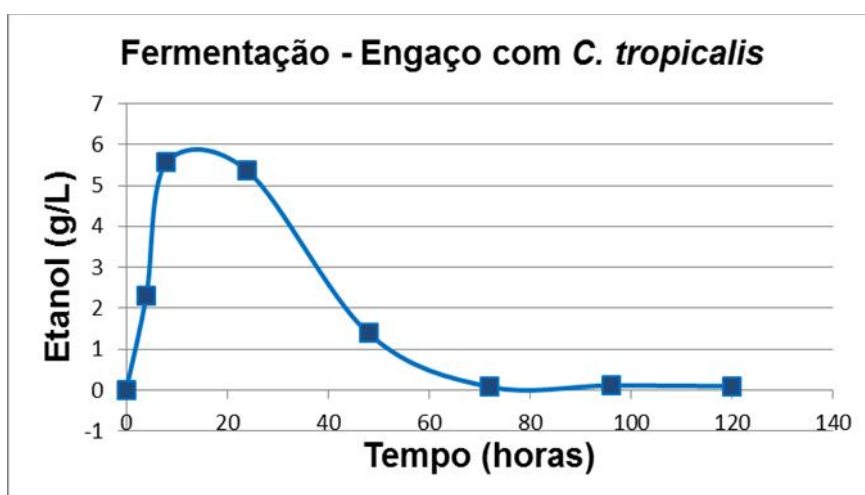


Figura 25: Produção de etanol pela levedura *Candida tropicalis* em hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

A maior produção de bioetanol com a levedura *Candida tropicalis* foi de 5,89 g/L, em 6 horas de fermentação, após este tempo observa-se que a produção

decrece conforme mostra a Figura 25. Este decréscimo pode ser uma explicação pela produção de outros compostos como o xilitol, ou inibição do micro-organismo por diversos fatores, como a própria concentração de etanol.

Segundo o trabalho de Carrion (2011) a levedura *Candida tropicalis* consegue assimilar outros tipos de açúcares presentes no hidrolisados. Em seu trabalho, o autor obteve consumo quase total dos açúcares presentes no liquor negro em 72 horas de fermentação. Estes açúcares eram xilose, glicose, galactose e arabinose, os quais foram convertidos em xilitol e etanol.

De acordo com Cassales (2010) quando a xilose atinge certo nível de concentração e ocorre aumento de oxigenação, o micro-organismo opta por consumir o etanol já produzido como sua principal fonte de carbono.

Quando o meio de cultivo está em condições aeróbias, alguns micro-organismos preferem converter grande parte da xilose a xilitol (WALFRIDSSON et al., 1995) apud CASSALES, 2010). Isto pode ter ocorrido no presente trabalho, sendo que não foi realizada análise de xilitol no experimento.

5.2.5. Experimento V: Consórcio dos micro-organismos com o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva

Neste experimento foram utilizadas as mesmas condições das fermentações realizadas pela bactéria *Zymomonas mobilis* e pela levedura *Candida tropicalis*, que foram: temperatura de 30 °C, pH inicial de 6, concentração de substrato de 5 % (m/v). Foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação.

A variação do pH no decorrer da fermentação foi de 6 para 5,55 como é mostrada na Figura 26.

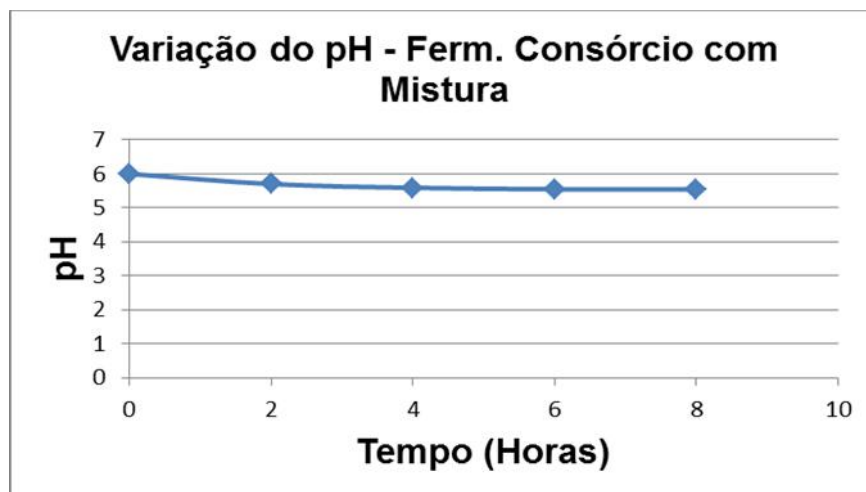


Figura 26: Variação do pH durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva incubado a 30 °C

5.2.5.1. Crescimento celular

A Figura 27 mostra o crescimento da biomassa durante o processo fermentativo utilizando o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva com o consórcio dos micro-organismos. Nesta Figura 27 observa-se um aumento constante do crescimento até as quatro horas de fermentação e depois permanece praticamente constante.

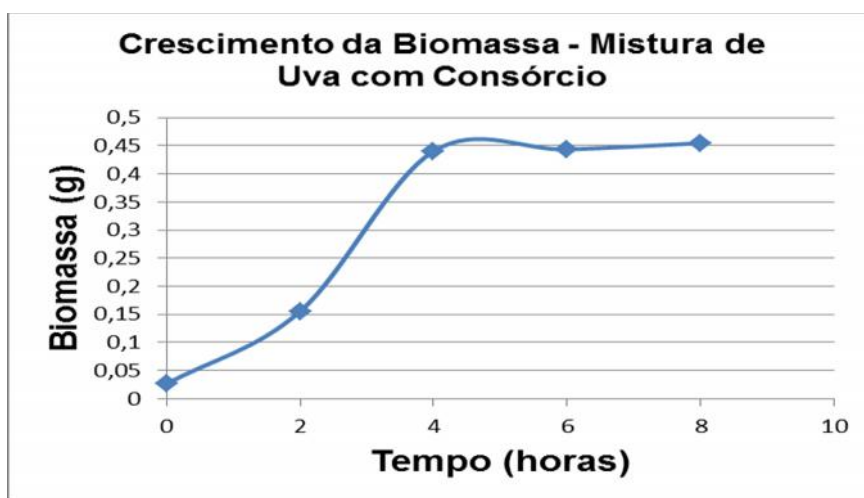


Figura 27: Crescimento da biomassa durante a fermentação pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.5.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

A Figura 28 mostra a produção de etanol, em g/L, realizada pelo consórcio de micro-organismos utilizando como substrato o hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva.

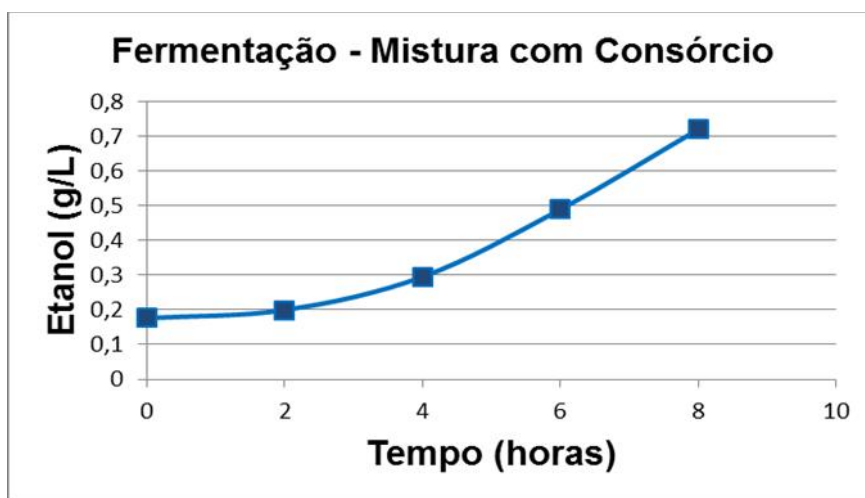


Figura 28: Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

A maior produção de etanol com o consórcio foi de 0,72 g/L, em 8 horas de fermentação, no entanto, a Figura 28 mostra que esta produção poderia continuar após este tempo, havendo necessidade de fazer outro experimento, com as mesmas condições para verificar este comportamento.

5.2.6. Experimento VI: Consórcio dos micro-organismos com o hidrolisado ácido do engaço de uva

Neste experimento foram utilizadas as mesmas condições que o experimento V, como descrito no item 5.2.5.

A variação do pH no decorrer da fermentação foi de 6 para 5,45 como é mostrada na Figura 29.

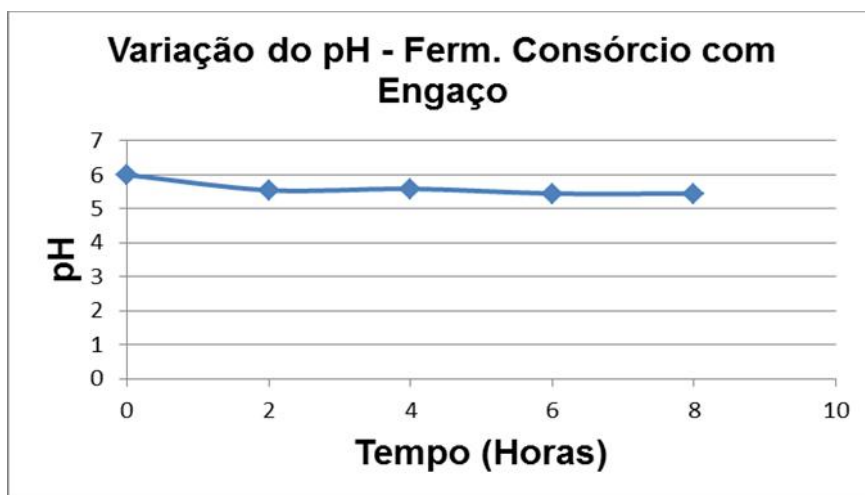


Figura 29: Variação do pH durante a fermentação realizada pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.6.1. Crescimento celular

O crescimento celular do consórcio dos micro-organismos é mostrado na Figura 30 durante o processo fermentativo utilizando o hidrolisado ácido do engaço uva. O crescimento ocorre moderadamente até as seis primeiras horas de fermentação e depois este começou a cair.

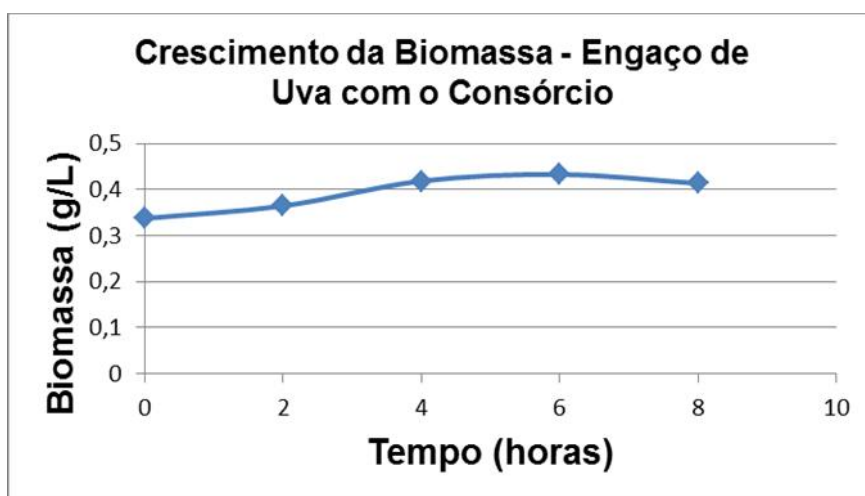


Figura 30: Crescimento da biomassa durante a fermentação pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

5.2.6.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

A produção de etanol, em g/L, é mostrada pela Figura 31. Este experimento foi realizado pelo consórcio de micro-organismos utilizando como substrato o hidrolisado ácido do engaço de uva.



Figura 31: Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos no hidrolisado ácido do engaço de uva nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30°C

A Figura 31 mostra que a maior produção de etanol com o consórcio nesta fermentação foi de 1,15 g/L, em 8 horas de fermentação. Entretanto, nesta Figura 31 observa-se também, que esta produção poderia continuar após este tempo, e para comprovar isto há necessidade de fazer outra fermentação, com as mesmas condições.

5.3. Fermentações utilizando meios semi-sintéticos

Nestes experimentos foram realizados testes com meios de cultura semi-sintéticos, utilizando a glicose como açúcar fermentescível para *Zymomonas mobilis* e para consórcio dos micro-organismos e a xilose para a *Candida tropicalis*. As condições testadas foram 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de

50g/L; e foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação.

A variação do pH no decorrer das fermentações utilizando meios semi-sintéticos como substratos tanto pela bactéria *Zymomonas mobilis* como pela levedura *Candida tropicalis*, separadamente e em consórcio, é mostrada na Figura 32.

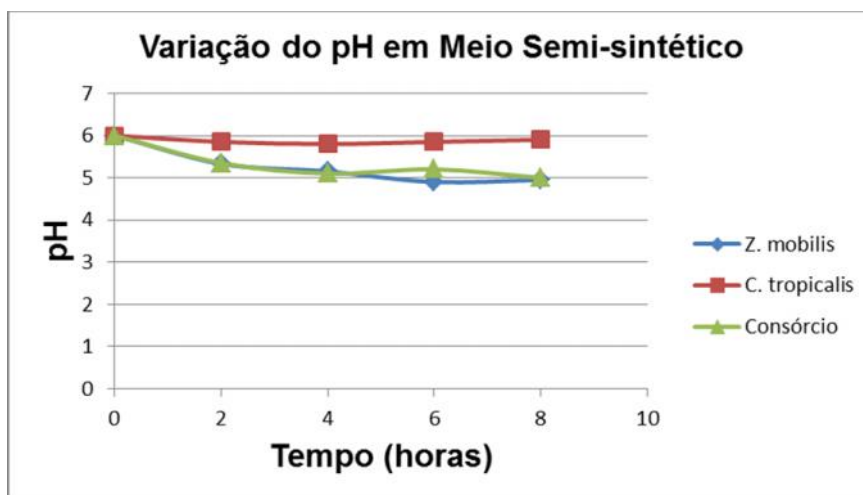


Figura 32: Variação do pH durante as fermentações em meios semi-sintéticos pelos micro-organismo nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

A Figura 36 mostra que o pH foi característico para cada micro-organismo utilizado, bem como para o consórcio. Observa-se que para a bactéria *Z. mobilis* o pH variou de 6 para 4,95. Para a levedura *C. tropicalis* praticamente não variou, já que se manteve entre 6 e 5,9. Entretanto, para o consórcio destes micro-organismos diminuiu de 6 para 5.

5.2.5.1. Crescimento celular

A Figura 33 mostra o crescimento da biomassa dos micro-organismos durante o processo fermentativo utilizando os meios de culturas semi-sintéticos. Assim, houve um crescimento característico tanto pela *Zymomonas mobilis*, quanto pela *Candida tropicalis*, no entanto, quando em consórcio este crescimento foi mais acentuado nas quatro primeiras horas de fermentação, e depois se manteve praticamente constante.

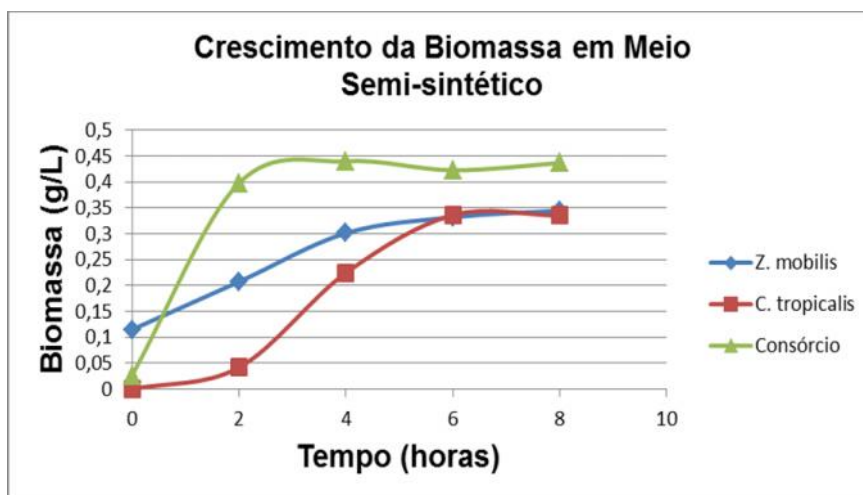


Figura 33: Crescimento da biomassa durante as fermentações realizadas pelos micro-organismos em meios semi-sintéticos nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

O crescimento celular da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *C. tropicalis* foi de 0,33 g/L em 6 horas de fermentação, e de 0,44 g/L em 4 horas do consórcio dos micro-organismos, depois de atingirem esta concentração, mantiveram-se praticamente estaveis no decorrer do processo.

5.2.5.2. Determinação da produção de bioetanol por cromatografia gasosa

A Figura 34 mostra as produções de etanol, em g/L, realizadas pela bactéria *Z. mobilis*, *C. tropicalis* e pelo consórcio de micro-organismos utilizando como substrato meios semi-sintéticos.

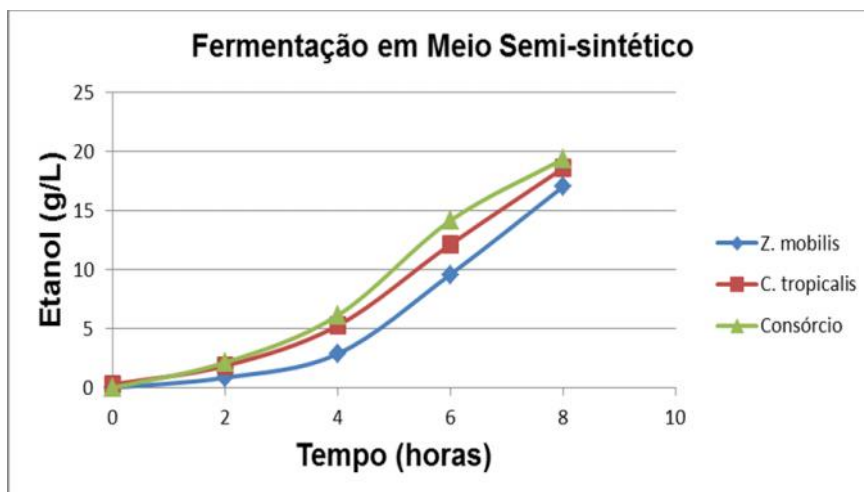


Figura 34: Produção de etanol pelo consórcio de micro-organismos em meio semi-sintético nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas incubado a 30 °C

A maior concentração de etanol produzida pela bactéria *Zymomonas mobilis* em meio semi-sintético (glicose 50g/L) foi de 17 g/L, em 8 horas de fermentação, pela levedura *Candida tropicalis*, que seu meio de cultura continha xilose (50 g/L), foi de 18,56 g/L, também em 8 horas de fermentação e pelo consórcio destes micro-organismos, no mesmo tempo de processamento, que continha como açúcar fermentescível a glicose (50 g/L), foi de 19,36 g/L de etanol.

6. CONCLUSÕES

A hidrólise ácida dos resíduos de uva com 1,5 % de ácido sulfúrico por 5 minutos foi eficaz na liberação dos açúcares fermentescíveis a serem utilizados em ambos os experimentos.

A fermentação de 48 horas realizada pela *Z. mobilis* mostrou que esta bactéria, no hidrolisado ácido da mistura (50 % engaço com 50 % bagaço fermentado) dos resíduos de uva, e a de 8 horas no hidrolisado ácido do engaço, não conseguiu produzir etanol nas condições de 30 °C; pH inicial de 6; concentração de substrato de 5 % (m/v).

Na fermentação de 8 horas com a levedura *C. tropicalis* no hidrolisado ácido da mistura (50 % engaço com 50 % bagaço fermentado) dos resíduos de uva, houve uma maior produção de etanol de 1,04 g/L em 6 horas de processamento. Na de 120 horas com a mesma levedura a detecção de etanol por cromatografia gasosa foi de 5,89 g/L em 6 horas também.

O consórcio destes micro-organismos, bactéria *Zymomonas mobilis* e levedura *Candida tropicalis*, no hidrolisado ácido da mistura dos resíduos de uva nas mesmas condições citadas, a maior produção de etanol foi em 8 horas de fermentação (0,72 g/L de etanol). Já no experimento com o hidrolisado ácido do engaço de uva pelo mesmo consórcio, a maior produção de etanol foi de 1,15 g/L no mesmo tempo.

Nos meios de cultivo semi-sintéticos, separadamente e em consórcio, as maiores produções de etanol, em g/L, foram de 17,0 para a bactéria *Zymomonas mobilis*, 18,56 para a levedura *Candida tropicalis* e 19,36 para o consórcio destes, todos em 8 horas de fermentação. Sendo assim, a aplicação do consórcio nos meios semi-sintéticos foi mais eficaz do que para cada micro-organismo separadamente.

Por outro lado, a aplicação do consórcio nos meios contendo o hidrolisado dos resíduos de uva já não obteve o mesmo sucesso, pois a levedura conseguiu produzir maior concentração de etanol no meio contendo o hidrolisado ácido do engaço de uva do que em consórcio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTINTAS, M. M.; ÜNGEL, K. Ö.; Kirdar, B.; ÖNSAN, Z. I.; OLIVER, S. G. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31.; 2002.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4. Disponível em <www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>. Acesso em março de 2014.

BAGCHI, D. et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v. 148, 2000.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: **A review. Energy Conversion And Management, Trabzon**, 2010.

BAMUFLEH, H. S.; ALHAMED, Y. A.; DAOUS, M. A. Furfural from midribs of datepalm trees by sulfuric acid hydrolysis. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 421-428, 2013.

BRODEUR, G. et al. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, Tallahassee, p.1-17, 2011.

BUCKERIDGE, M. S, SANTOS W.D, SOUZA, A.P ; **As Rotas para o Etanol Celulósico no Brasil**. Departamento de Botânica – IBUSP, Cidade Universitária - Butantã ,São Paulo, 2007.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**. v. 28, p. 237-259, 2008.

CADETE, R. M.; et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS yeast Res.** v. 9, 2009.

CARDONA, C.A, QUINTERO, J. A.; PAZ, L.C. Production of bioethanol from the sugar cane bagasse: Status and Perspectives. **Bioresource Technology**, Manizales, p.4754-4760, 2010.

CARRION, L. M. **Isolamento de leveduras fermentadoras de pentoses e suas aplicações na produção de xilitol e etanol a partir de licor negro proveniente do processo kraft de extração da celulose.** 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2011.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por micro-organismos sobre este hidrolisado.** 2010. 138p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CATALUÑA, Ernesto Veses. As uvas e os vinhos. 3.ed. São Paulo: **Globo**, 1991. 215 p.

COLOMBARI, F. M.; **Tratamentos físico-químicos de bagaço de cana para produção de etanol por meio de hidrólise enzimática. (2011).** Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto-SP.

DAS, A. et al. Bioconversion of rice straw to sugar using multienzyme complexo fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. **Industrial Crops and Products.** v. 46, p. 217-225, 2013.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, St. Paul. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

D'ALMEIDA, M.L.O. (1988). Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT**-, 2ª Edição, v. 1, Capítulo III, p. 45-106.

EMBRAPA. **Cultivo da Videira. Caracterização Social e Econômica da Cultura da Videira**, 2010. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Caracterizaca_social_da_%20videira.html. Acesso em Março de 2015.

EMBRAPA UVA E VINHO. Banco Ativo de Germoplasma de Uva: Bordô. Base de dados, Bento Gonçalves, 1984. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/germoplasma/?situacao=acesso&introducao=2148&index=171>>. Acesso em 20 Janeiro 2015.

EMBRAPA, 2011. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32985/1/CITE-04.pdf>> Aceso em 20 de Janeiro de 2015.

EMBRAPA, 2014. **Etanol Lignocelulósico**. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/887226/1/Etanolcelulosico.pdf>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2015.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. 167p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

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

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 32, n. 1, p. 21-26. 2010.

FERRARI, Valdecir. **A sustentabilidade da vitivinicultura através de seus próprios resíduos**, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agronomia/materiais/userfiles/ArtigoResiduodeuva.pdf>. Acesso em Março de 2015.

FERREIRA, J. **Produção de Levana e Bioetanol Utilizando Cascas de Banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

FERREIRA, L. C. C. **Caracterização do potencial energético entre a produção de etanol celulósico e a cogeração a partir do bagaço de cana**. 68 f. Relatório (Graduação) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade De Brasília, Brasília, 2012.

FLORENCIO, C.; **Micro-organismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.** (2011). Disponível em <ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/78896/1/DissCF.pdf>. Acesso em Março de 2014.

GOBBATO, Celeste. Manual do viti-vinicultor brasileiro – V.2 – Enologia. 4.ed. Porto Alegre: **Livraria Globo**, 1942. 473 p.

GUTIERREZ, L.E. ; AMORIM, H.V. ; BASSO, L.C. (1991). **Inibidores da fermentação alcoólica**. STAB, Açúcar, álcool e subprodutos. Piracicaba, v. 9, n. 6, p.24-30.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Ev Wageningen, p.10-18, 2009.

HICKER, L. R. et al. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICM D254 in synthetic médium and rice hull hydrolysate. **Bioresouce Technology**. v. 131, p. 508-514, 2013.

HUANG, C. et al. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 3322-3329, 2011.

JAMAI, L. et al. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Sacharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 204, p. 375-379, 2001.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic Biomass Processing: **A Perspective**. **International Sugar Journal**, v. 106, p. 12-23, 2004.

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT. E.L.; SANDERS, J.P.M. (2009). **Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31. Disponível em <www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1>. Acesso em janeiro de 2014.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**. v. 24, n. 68, p. 223-253. 2010.

LEE, J. (1997). **Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24.

LEMOES, J.L.S. (2001). **Estudo da produção de xilanases por Aspergillus awamori em bagaço de cana**. Tese de Doutorado. Programa de Pós- graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LETTI, L. A. J. et al. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 44, p. 80-86, 2012.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais** v. 1, n. 2, p. 5-18. 2007.

LIU, Z. et al. Isolation and cationization of hemicelluloses from pre-hydrolysis liquor of Kraft-based dissolving pulp production process. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 1789-1796, 2011.

LLOBERA, A.; CANELLAS, J. Dietary fiber content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinífera*): Pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007).

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R, S. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020". **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582-595.

MANICA, I. **Uva - do plantio a produção, pós-colheita e mercado**. Ed. Cinco Continentes. (2012). Disponível em: <http://www.suapesquisa.com/frutas/uva.htm>. Acesso em junho de 2013.

MARTÍN, J. F. G. et al. Ethanol production from olive pruning's by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**. v. 35, p. 1602-1608, 2010.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2010). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. **Produção brasileira de etanol**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em dezembro de 2013.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). **Uva**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em junho de 2014.

MAZAHARI, D. et al. Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**. v. 99, p. 372-378, 2012.

MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141 – 178, 1980.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocelluloses: Biofuels, platform chemical e biorefinary concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of anthocyaninns from dried red grape pomace. **Journal og Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 0 2862-2868, 2010.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. (2005). Chemical analysis of Pinus oocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470.

MORO, M. R. **Produção de etanol e levana por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato**. 2012. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 153, n. 2, p. 375-380, 1944.

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

NORONHA, L. L. et al. Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**. v. 33, p. 1698-1702, 2010.

OBEROI, H. S. et al. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. **Process Biochemistry**. v. 45, p. 1299-1306, 2010.

OLIVEIRA, L. T.; VELOSO, J. C. R.; TERAN-ORTIZ, G. P. **Caracterização físico-química da farinha de semente e casca de uva**. II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí, Brasil, 2009.

PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 32, p. 596-602, 2008.

PEREIRA JÚNIOR, N. et al. **Enzimas na produção de etanol**. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado**. 1ª ed. Rio de Janeiro. Interciência Brasil. (2008). Disponível em <ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/78896/1/DissCF.pdf>. Acesso em Março de 2014.

PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, Curitiba, p.1-8, 2012.

PROZIL, S.; MENDES, J.; EVTUGUIN, D.; LOPES. (2013). Caracterização do Engaço da Uva e Avaliação do seu Potencial como Matéria-Prima Lenhocelulósica. **Millenium**, 44 (janeiro/junho). Pp. 23-40.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

RABELO, S. C. **Avaliação e Otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração** – Campinas, SP, 2010.

RANZAN, C. **Fermentação contínua de *Zymomonas mobilis*: modelagem, ajuste de parâmetros e interferências a partir do consumo de hidróxido de sódio**. 2010. 151p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RATNAM, B. V. V.; et al. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from Palmyra jiggery using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. n. 21, p. 399-404. 2005.

RATTANACHOMSRI, U. et al, Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 107, p. 488-493, 2009.

RIZZON, L.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.20, n.1, p. 115-121, 2000. RODOLFO SCHLEIER: **CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS DE *Vitis vinifera* L. (UVA)**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/Monografia_Vitis_vinifera.pdf>. Acesso em: 13 de Fevereiro de 2015.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucralose into ethanol by a flocculant *Zymomonas* sp. Isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**. v. 8, p. 745-748, 1986.

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

SANTOS, M. D. R. **Desenvolvimento de métodos cromatográfico (HPLC-UV) para a determinação de ácidos fenólicos extraídos por ultra-som de forrageiras tropicais**. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

SCORDIA, D. et al. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054, **Biomass and Bioenergy**. v. 39, p. 296-305, 2012.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 00, p. 469-474, 2000.

SILBIR, S.; DAGBAGLI, S.; YEGIN, S.; BAYSAL, T.; GOKSUNGUR, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**. V. 99, p. 454-461, 2014.

Silva, C. D. S. R., **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT1891**, 2014. Disponível em: http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110507/000791305_20150801.pdf?sequence=1. Acesso em Março de 2015.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrólise de palha de arroz**, 2007. 146f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Lorena- SP.

SILVA, N. L. C.; **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. (2010). Disponível em <www.ladebio.org.br/.../bioetanol-2a-geracao-de-biomassa-residual.pdf>. Acesso em Março de 2014.

SILVA, R. et al. **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos**. **Química Nova** [online], v.32, n.3, p.661-671, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a10v32n3>>. Acesso em dezembro de 2013.

SINGH, L. K.; MAJUMDER, C. B.; GHOSH, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal**. v. 82, p. 150-157, 2014.

SOCCOL, C. R. et al. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**, p. 101-122, 2011.

SOMOGYI, M. Notes na sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, n. 1, p. 19-22, 1952.

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

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Ciências Agrárias**. v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.

TOMÁZ-PEJÓ, E. et al. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Madrid: Elsevier, 2011. p. 149-176.

TORRES, F. E.; BARATTI, J. (1988). Ethanol production from wheat flour by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, p. 167-172.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 894 p. (2005).

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por micro-organismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 2003. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 2003.

VARMA, R. J.; GAIKWAD, B. G. Biodegradation and tolerance by recycle cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 63, p. 539-542, 2009.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,

VILLEN, R. A. Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009.

WALFRIDSSON, M. et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, p. 4184-4190, 1995 apud CASSALES, a. r. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por micro-organismos sobre este hidrolisado**. 138f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WANG, Y. et al. Hydrolysis kinetics characteristic of recycle fiber in subcritical water. **Bioresource Technology**. v. 105, p. 152-159, 2012.

WEI, P. et al., A review of membrane technology for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 388-400, 2014.

ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. EMBRAPA Uva e Vinho - CNPUV (Documentos). Bento Gonçalves, 69 p. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 25 Janeiro. 2015.

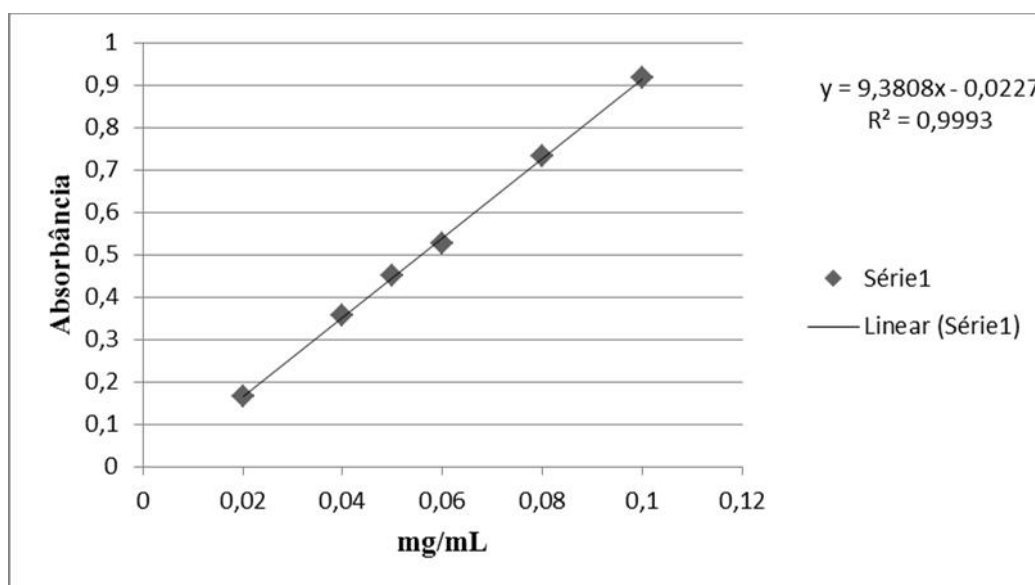
ZHANG, J.; SMITH, K.R. (2007). Household air pollution from coal and biomass fuels in China: **Measurements, health impacts, and interventions**. **Environ. Health Perspect.**, v. 115, n. 6, p. 848–855.

APÊNDICES

Apêndice 1A: Concentração de glicose e absorbância (490 nm) para padronização da curva padrão de açúcares totais.

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,02	0,165
0,04	0,357
0,05	0,450
0,06	0,526
0,08	0,733
0,1	0,916

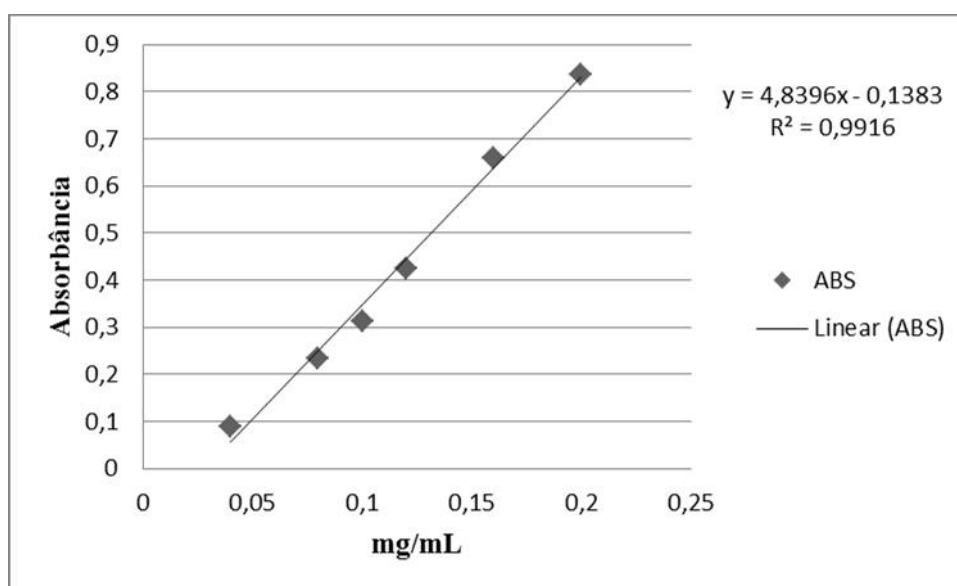
Apêndice 1.1A: Curva padrão para açúcares totais.



Apêndice 2A: Concentração de glicose e absorbância (540 nm) para construção da curva padrão de açúcares redutores

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,04	0,089
0,08	0,235
0,10	0,314
0,12	0,424
0,16	0,659
0,20	0,837

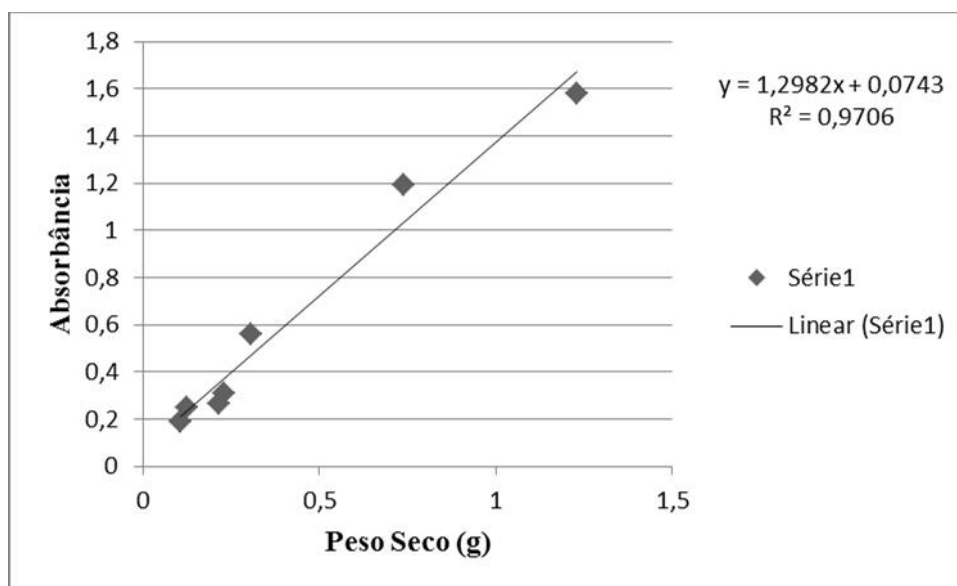
Apêndice 2.1A: Curva padrão para açúcares redutores



Apêndice 3A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para construção da curva padrão do crescimento celular

Peso Seco (g)	Absorbância
0,105	0,192
0,125	0,251
0,215	0,265
0,230	0,310
0,305	0,558
0,740	1,193
1,23	1,582

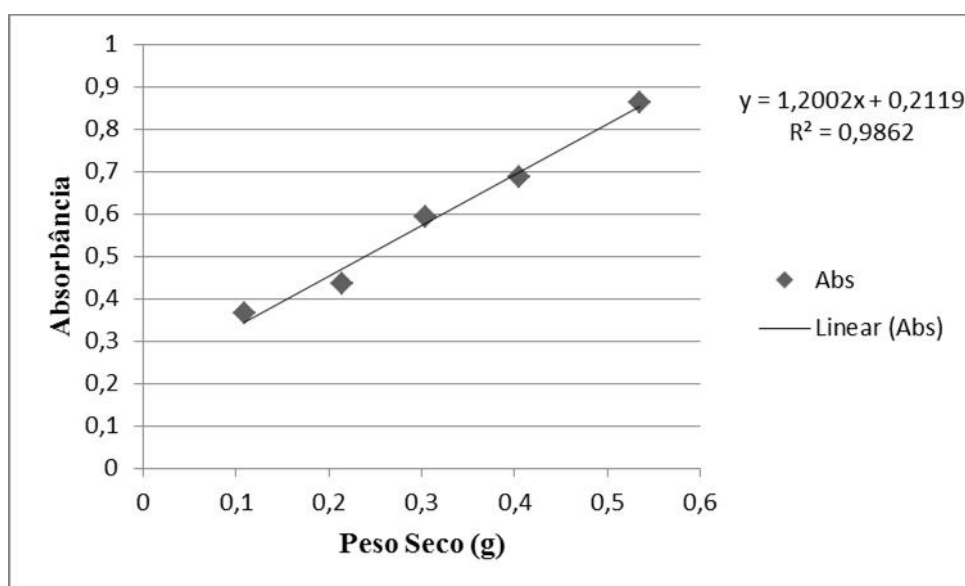
Apêndice 3.1A: Curva padrão da biomassa da bactéria *Zymomonas mobilis* após 72 horas de crescimento.



Apêndice 4A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria *Candida tropicalis* para construção da curva padrão do crescimento celular

Peso Seco (g)	Absorbância
0,110	0,366
0,215	0,434
0,305	0,593
0,405	0,434
0,535	0,863

Apêndice 4.1A: Curva padrão da biomassa da levedura *Candida tropicalis* após 72 horas de crescimento.



Apêndice 5A: Produção de etanol por cromatografia gasosa.

Etanol (g/L)	Área
7,89	3215136
15,78	5188833
39	13744592
63	20126139
71	21960779

Apêndice 5.1A: Curva padrão da produção de etanol por cromatografia gasosa.

