



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

ÍTHALO BARBOSA SILVA DE ABREU

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL COM RESÍDUOS DE ALIMENTOS:  
Avaliação de Hidrólises Ácida, Enzimática e Fermentação com Diferentes Leveduras**

Recife  
2022



CARACTERIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DE RESERVATÓRIOS, ENERGIAS RENOVÁVEIS  
E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Apoio



Gestão



ÍTHALO BARBOSA SILVA DE ABREU

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL COM RESÍDUOS DE ALIMENTOS: Avaliação de  
Hidrólises Ácida, Enzimática e Fermentação com Diferentes Leveduras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de concentração: Fontes Renováveis de Energia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo

Recife

2022

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- A162p Abreu, Íthalo Barbosa Silva de.  
Produção de bioetanol com resíduos de alimentos: avaliação de hidrólises ácida, enzimática e fermentação com diferentes leveduras. / Íthalo Barbosa Silva de Abreu. – 2022.  
87 f.: il.
- Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra.  
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luíz Silveira Sonogo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.  
Inclui referências.
1. Combustíveis. 2. Resíduos urbanos. 3. Enzimas. 4. Digestão ácida.  
5. Reciclo. 6. Biocombustíveis. I. Dutra, Emmanuel Damilano (orientador).  
II. Sonogo, Jorge Luíz Silveira (coorientador). III. Título.

662 CDD (22. ed.)

UFPE  
BCTG/2022-129

ÍTHALO BARBOSA SILVA DE ABREU

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL COM RESÍDUOS DE ALIMENTOS: Avaliação de Hidrólises Ácida, Enzimática e Fermentação com Diferentes Leveduras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de concentração: Fontes Renováveis de Energia.

Aprovado em: 22/02/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dr. Allan de Almeida Albuquerque (Membro Externo)  
PRH 48.1/UFPE/ANP/FINEP

---

Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha (Membro Externo)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

---

Dr. Rafael Barros de Souza (Membro Externo)  
Universidade de Pernambuco - UPE

Dedico este trabalho ao meu pai, Aderval Barbosa de Abreu (*in memoriam*), meu maior exemplo de força e honestidade.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aderval (*in memorian*) e Sandileusa, pelo apoio, e todo amo dedicado a mim. Sou quem sou principalmente por eles.

À minha irmã, Thailinne, por todo apoio e atenção, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus primos e melhores amigos, Carla, Érika e Halberto, por sempre estarem dispostos a ouvir minhas reclamações, e por todas as comemorações em cada pequena vitória.

À minha namorada, Karol, por me apoiar em minhas decisões, me motivar, e enxergar o melhor em mim, mesmo quando eu não o enxergasse. Obrigado por ser meu porto seguro.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo ensino, estrutura e pela acolhida durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares pelo apoio e profissionalismo.

Ao professor Emmanuel Damilano Dutra, pela orientação, dedicação e pelo auxílio ao meu crescimento intelectual.

Ao Professor Jorge Luiz Silveira Sonogo, pela orientação e sugestões para a construção deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica, João e Jéssica, pelo auxílio nos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, por contribuírem com o enriquecimento deste trabalho.

Ao Grupo de Energia da Biomassa, por terem me acolhido como parte da equipe.

Ao Laboratório de Metabolismo Microbiano, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco, em especial ao Prof. Dr. Rafael Barros de Souza, e a mestranda Rayssa, pelas análises realizadas.

À Bárbara pela leitura deste trabalho e considerações enriquecedoras.

Aos colegas, Bárbara, Habila, Natache, Pablo, Daniela, Edilândia, Tássia e Ivson, pelo apoio, auxílio no dia a dia e os momentos de descontração na hora do almoço.

À **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP**, por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP/FINEP, pelo apoio financeiro, suportado com recursos provenientes do investimento de empresas petrolíferas qualificadas na Cláusula de P, D&I da Resolução ANP nº 50/2015. Em particular ao **PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias renováveis e Biotecnologia Ambiental” (PROCESSO ANP Nº48610.201019/2019-38)**, do Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE.

*"A maior das descobertas científicas foi a descoberta da ignorância. Uma vez que os humanos se deram conta de quão pouco sabiam sobre o mundo, eles tiveram um motivo muito bom para ir em busca de conhecimento, o que abriu o caminho científico para o progresso."*

(HARARI, 2016, p. 297)

## RESUMO

Os Resíduos de Alimentos (RA) são emissores de gases de efeito estufa no ambiente, além de contribuírem para a contaminação de solos e lençóis freáticos. Esse material, contudo, possui um grande potencial para a produção de biocombustíveis e bioprodutos, podendo ter seus impactos minimizados através de seu aproveitamento energético. Neste sentido, o presente trabalho objetivou investigar o uso de RA para a produção de açúcares fermentescíveis e bioetanol. Usando celulasas e amilases como enzimas digestivas, ensaios de hidrólise enzimática de RA foram realizados com e sem prévia etapa de remoção de lipídios. A hidrólise ácida de RA foi avaliada sob diferentes valores de tempo de processo (20, 40 e 60 min), temperatura (111, 120 e 127 °C), concentração de ácido sulfúrico (0,5; 1,0 e 1,5%) e carga de sólidos (5, 10 e 15%) usando dois planejamentos experimentais. A produção de bioetanol foi realizada em fermentação submersa estática usando diferentes cepas de leveduras a 10% (m úmida/v) e hidrolisados enzimáticos e ácidos como fontes de açúcar. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 e P6H9, *Dekkera bruxellensis* (DB) e *Meyerozyma caribbica* (CB) foram testadas nesta etapa. Para a hidrólise enzimática, obteve-se uma maior concentração de açúcares redutores (AR) para os RA desengordurados e hidrolisados com amilases ( $36,8 \pm 2,7$  g/L). Para o planejamento experimental, obteve-se uma maior concentração de AR no ensaio com 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos, 1 h e 127 °C, o qual foi realizado para o material desengordurado. A concentração de AR para o desengordurado ácido foi de  $83,71 \pm 2,64$  g/L. Observou-se que o processo de extração de lipídios não influencia no processo hidrolítico, tanto enzimático quanto ácido. Foi possível recircular o ácido utilizado no processo, obtendo-se uma concentração de  $120,98 \pm 8,87$  g/L de AR no 3º ciclo do RA não tratado. P6H9, DB e MC produziram cerca de 30 g/L de bioetanol para os hidrolisados ácidos de 1º ciclo não tratado e para os hidrolisados enzimáticos, resultado superior ao de JP1, com produção de 20 g/L de bioetanol. Os resultados demonstraram o potencial de aproveitamento dos RA para a produção de bioetanol através da rota ácida e fermentação com P6H9, MC e DB.

**Palavras-chave:** resíduos urbanos; enzimas; digestão ácida; reciclo; biocombustíveis.

## ABSTRACT

Food Waste (FW) emits greenhouse gases into the environment and contributes to soil and groundwater contamination. This material, however, has excellent potential to produce biofuels and bioproducts, and its impacts can be minimized through its energy use. In this sense, the present work aimed to investigate the use of FW to produce fermentable sugars and bioethanol. Using cellulases and amylases as digestive enzymes, FW enzymatic hydrolysis assays were performed with and without a previous lipid removal step. The acid hydrolysis of FW was evaluated under different values of process time (20, 40, and 60 min), temperature (111, 120, and 127 °C), sulfuric acid concentration (0.5, 1.0, and 1.5 %), and solids loading (5, 10 and 15%) using two experimental designs. Bioethanol production was carried out in static submerged fermentation using different yeast strains at 10% (wet m/v) and enzymatic and acid hydrolysates as sugar sources. Strains of *Saccharomyces cerevisiae* JP1 and P6H9, *Dekkera bruxellensis* (DB), and *Meyerozyma caribbica* (MC) were tested. A higher concentration of reducing sugars (RS) was obtained for FW defatted and hydrolyzed with amylases ( $36.8 \pm 2.7$  g/L) for enzymatic hydrolysis. For the experimental design, a higher concentration of RS was obtained in the test with 1.5% sulfuric acid, 15% solids, 1 h, and 127 °C, which was performed for the degreased material. The RS concentration for the acid defatted was  $83.71 \pm 2.64$  g/L. It was observed that the lipid extraction process does not influence the hydrolytic process, both enzymatic and acidic. It was possible to recirculate the acid used in the process, obtaining a  $120.98 \pm 8.87$  g/L of RS in the 3rd cycle of untreated FW. P6H9, DB, and MC produced about 30 g/L of bioethanol for the untreated 1st cycle acid hydrolysates and for the enzymatic hydrolysates, a result superior to that of JP1, with a production of 20 g/L of bioethanol. The results demonstrated the potential of using FW to produce bioethanol through the acid route and fermentation with P6H9, MC, and DB.

**Keywords:** municipal solid waste; enzymes; acid digestion; recycle; biofuels.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Disposição final do Resíduo Sólido Urbano (RSU) coletado no Brasil em 2019.	25
Figura 2 –	Índice de coleta de Resíduo Sólido Urbano (RSU), em 2019, por região do Brasil.	25
Figura 3 –	Perda e desperdício de alimento pela cadeia produtiva e de consumo.	27
Figura 4 –	Esquema representativo do conceito de bioeconomia circular através da valorização de resíduo de alimento.	30
Figura 5 –	Conceitos de reduzir, reusar e reciclar aplicados aos resíduos de alimentos.	31
Figura 6 –	Fluxograma de produção de bioetanol de 2ª geração.	32
Figura 7 –	Estrutura do amido: amilose e amilopectina.	35
Figura 8 –	Estrutura semi-helicoidal da ligação entre amilose e lipídio.	36
Figura 9 –	Componentes bioquímicos de biomassa e potenciais inibidores de microrganismos fermentativos.	37
Figura 10 –	Resíduos de alimentos de refeitórios adicionados à estufa para secagem a 65°C durante 1 semana.	39
Figura 11 –	Resíduos de alimentos obtidos após secagem e trituração em moinho tipo Willey até granulometria de 30 mesh.	40
Figura 12 –	Curva de calibração do reagente 3,5-dinitrossalicílico (DNS) para determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART).	50
Figura 13 –	Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, após hidrólise enzimática, com diferentes complexos enzimáticos, de resíduo de alimento (RA) não tratado, a 55 °C, 150 rpm, pH 6,0 e 10% de sólidos. C = controle, CEL = cellic CTec 2, AM = $\alpha$ -amilase e amilogucosidase, CEL + AM = $\alpha$ -amilase,	54

amiloglucosidase e cellic CTec2. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança.

- Figura 14 – Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, após 56 hidrólise enzimática, com diferentes complexos enzimáticos, de resíduo de alimento (RA) desengordurado, a 55 °C, 150 rpm, pH 6,0 e 10% de sólidos. C = controle, CEL = cellic CTec 2, AM =  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, CEL + AM=  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e cellic CTec 2. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança.
- Figura 15 – Gráfico de Pareto para Açúcares Redutores (AR) do 59 planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).
- Figura 16 – Superfície de resposta para variável Açúcares Redutores 60 (AR) do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração constante de ácido (0,5% v/v).
- Figura 17 – Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores Totais 62 (ART) do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).
- Figura 18 – Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores (AR) do 64 planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).
- Figura 19 – Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores Totais 64 (ART) do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).
- Figura 20 – Variação do pH do líquido hidrolisado para experimentos de 67 reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min).
- Figura 21 – Rendimento mássico para experimentos de reciclo de 68 hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de

sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança.

- Figura 22 – Resultados de AR (g/L) para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança. 68
- Figura 23 – Resultados de ART (g/L) para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança. 69
- Figura 24 – Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, para fermentação estática à temperatura ambiente (25 – 30 °C) com diferentes leveduras ao longo do tempo. a) JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial, b) P6HMF9 = *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para tolerar maiores teores de HMF, c) DB = *Dekkera bruxellensis*, d) MC = *Meyerozyma caribbica*. DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado. 72
- Figura 25 – Consumo de Açúcares Redutores (AR), em %, após 24 h de fermentação de meios hidrolisados ácidos e enzimáticos, com diferentes leveduras, a 10% de sólidos, estática e à temperatura ambiente (25 – 30 °C). JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial; P6HMF9 = *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para tolerar maiores teores de HMF; DB = *Dekkera bruxellensis*; MC = *Meyerozyma caribbica*; DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida 75

não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático  
desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol de segunda geração.	33
Tabela 2 –	Níveis do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).	42
Tabela 3 –	Matriz do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).	42
Tabela 4 –	Níveis do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).	43
Tabela 5 –	Matriz do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).	43
Tabela 6 –	Fatores de conversão para caracterização de celulose e hemicelulose.	48
Tabela 7 –	Composição química de resíduo de alimento deste estudo e de estudos anteriores.	53
Tabela 8 –	Variáveis de resposta do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).	58
Tabela 9 –	Análise de variância para variável AR do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).	60
Tabela 10 –	Variáveis resposta do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).	63
Tabela 11 –	Composição química do resíduo de alimento de refeitório não tratado, desengordurado, e após ciclos de hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1,5% (v/v), 127 °C, 15% de carga de sólidos durante 1 h em autoclave de bancada. 1 IN = 1° ciclo não tratado; 2 IN = 2° ciclo não tratado; 3 IN = 3° ciclo	71

não tratado; 1 DEN = 1° ciclo desengordurado; 2 DEN = 2° ciclo desengordurado; 3 DEN = 3° ciclo desengordurado.

Tabela 12 – Produção de bioetanol, em g/L, após 24 h de fermentação de meios hidrolisados ácidos e enzimáticos, com diferentes leveduras, a 10% de sólidos, estática e à temperatura ambiente (25 – 30 ° C). JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial; P6H9 = *Saccharomyces cerevisiae* adaptada para tolerar maiores teores de HMF; DB = *Dekkera bruxellensis*; MC = *Meyerozyma caribbica*; DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABRELPE	Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
ACV	Análise de Ciclo de Vida
AM	$\alpha$ -amilase e amiloglucosidase
ANOVA	Análise de Variância
AR	Açúcares Redutores
ART	Açúcares Redutores Totais
ATP	Adenosina Trifosfato
BERSO	Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos
CBP	<i>Consolidated Bioprocessing</i>
CEASA	Central de Distribuição de Alimentos
CEL	Cellic CTec 2
CEL + AM	$\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e cellic CTec2
CH <sub>4</sub>	Gás metano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico (dióxido de carbono)
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DEN	desengordurado
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FPU	<i>Filter Paper Unity</i>
GEE	Gases de Efeito Estufa
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HMF	5-hidroxiacetilfurfural
IN	Não tratado
m/v	Massa por volume
Ma	Massa da amostra seca
Mc	Massa do cartucho
Mcz	Massa de cinzas
Mr	Massa final
Mi	Massa de biomassa inicial
Mis	Massa de lignina insolúvel seca
ND	Não determinado
ONU	Organização das Nações Unidas
PCI	Poder Calorífico Inferior
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RA	Resíduos de Alimentos
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos

SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
U/mL	Unidades de atividade enzimática por mL de enzima
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v/v	Volume por volume
YEPD	<i>Yeast Extraxct Peptone Dextrose</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>24</b>
3.1	RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS	24
3.2	RESÍDUOS DE ALIMENTOS	26
3.3	IMPACTOS AMBIENTAIS DOS RESÍDUOS DE ALIMENTOS	28
3.4	APROVEITAMENTO QUÍMICO E ENERGÉTICO DOS RESÍDUOS DE ALIMENTOS	29
3.5	BIOETANOL	31
<b>3.5.1</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>33</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Hidrólise</b>	<b>34</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Fermentação</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
4.1	FONTE DE RESÍDUOS DE ALIMENTOS	39
<b>4.1.1</b>	<b>Extração de Lipídios</b>	<b>40</b>
4.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	40
4.3	HIDRÓLISE ÁCIDA	41
<b>4.3.1</b>	<b>Planejamento Experimental</b>	<b>41</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Reciclo</b>	<b>44</b>
4.4	FERMENTAÇÃO	44
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	45

<b>4.5.1</b>	<b>Teor de Umidade</b>	<b>45</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Teor de Lipídios</b>	<b>45</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Teor de Proteínas</b>	<b>46</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Teor de Solúveis em Água</b>	<b>46</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Teor de Extrativos</b>	<b>47</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Teores de Glucano, Hemicelulose, Cinzas e Lignina</b>	<b>47</b>
<b>4.5.7</b>	<b>Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais</b>	<b>49</b>
<b>4.5.8</b>	<b>Teor de Etanol</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO DE ALIMENTO</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</b>	<b>54</b>
<b>5.3</b>	<b>HIDRÓLISE ÁCIDA</b>	<b>57</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Planejamento Experimental com Concentração de Ácido Constante</b>	<b>57</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Planejamento Experimental com Temperatura Constante</b>	<b>62</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Reciclo</b>	<b>65</b>
<b>5.4</b>	<b>FERMENTAÇÃO</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e a intensificação do processo de urbanização ocasionaram o aumento na geração de resíduos nas cidades. Esse material, denominado Resíduo Sólido Urbano (RSU), figura como um problema para gestão ambiental nos municípios. O descarte irregular à céu aberto (conhecido como lixão) gera problemas de mau odor, contaminação de solos e lençóis freáticos, emissão de gases de efeito estufa (GEE) e problemas sociais, principalmente com as condições de trabalho precárias a que são submetidos catadores nesses locais (MEDEIROS *et al.*, 2020). De acordo com a legislação brasileira, os RSU devem ser depositados em aterros sanitários, os quais costumam ser distantes dos grandes centros urbanos, ter uma baixa vida útil e gerar impactos ambientais negativos (GOMES *et al.*, 2015). O RSU no Brasil é bastante heterogêneo, possuindo, em sua composição materiais recicláveis, dejetos e matéria orgânica. Quanto a fração orgânica, cerca de 40% é constituída de Resíduos de Alimentos (RA) (KARMEE, 2016). Os principais constituintes dos RA são carboidratos, lipídios e proteínas, tornando um meio propício para a proliferação de microrganismos, que liberam CO<sub>2</sub> em aerobiose e CH<sub>4</sub> em anaerobiose ao degradar esses compostos.

Por outro lado, a composição orgânica dos RA encoraja o seu uso como substrato, visando a obtenção de diversos bioprodutos. Nesse cenário, há um grande potencial para a produção de biodiesel, bioóleo e bioetanol (KARMEE, 2016); biogás (ZHANG; SU; TAN, 2013); biohidrogênio (HAN; SHIN, 2004); e outros produtos químicos finos (SHARMA *et al.*, 2021). O bioetanol, por exemplo, é bastante difundido no Brasil, sendo produzido essencialmente a partir da cana-de-açúcar e do milho. Apesar de possuir menor eficiência que combustíveis fósseis, é hoje o biocombustível mais empregado no país, seja como aditivo na gasolina, seja como seu substituto (ROSSETO *et al.*, 2017). Segundo a Agência Internacional de Energia Renovável (IRENA), a transição energética tem sido proposta pela sociedade a fim de diversificar a matriz de combustíveis e encorajar a geração de energia a partir de fontes renováveis, como solar, eólica e de biomassa (IRENA, 2018).

Neste cenário, o uso dos RA como substrato para a produção de bioetanol pode mitigar o impacto ambiental bem como contribuir com a transição energética. A possibilidade de se utilizar RA para a produção de bioetanol tem sido amplamente discutida, incluindo diferentes métodos de processamento e arranjos globais do

processo (SAEED *et al.*, 2018). Contudo, antes de realizar esses processos, é necessário conhecer a composição química desse material, em especial de carboidratos, os quais serão convertidos a açúcares fermentescíveis. Alguns autores realizam essa caracterização por diferença de massa entre as demais frações da biomassa, não diferenciando quais os carboidratos presentes, o que pode dificultar a produção, já que os polissacarídeos possuem características de hidrólise diferentes (HAFID *et al.*, 2017; NAROZNOVA, MØLLER, SCHEUTZ 2016).

A hidrólise desses carboidratos pode ser realizada com ou sem prévio pré-tratamento de biomassa, tais como o uso de microondas (ALAMANOU *et al.*, 2015), de processos hidrotérmicos (MATSAKAS *et al.*, 2014) e de extração de lipídios (TAHERI *et al.*, 2021). Durante a hidrólise enzimática, as enzimas podem interagir com os lipídios, reduzindo-se a eficiência, contudo essa hipótese precisa ser melhor avaliada (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). O processo de hidrólise com ácidos diluídos também é reportado (HAFID *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018), alcançado eficiências acima de 40% de conversão para obtenção de carboidratos fermentescíveis. Contudo, faltam estudos que melhor avaliem os fatores desse processo, de forma a otimizá-lo. Além disso, recircular a fração ácida usada na hidrólise pode reduzir custos e aumentar a concentração de açúcares disponíveis para os microrganismos. A fermentação, geralmente realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pode ter sua eficiência melhorada ao se utilizar outras cepas de leveduras. Estudos demonstram a capacidade das leveduras *Meyerozyma caribbica* (SAEED *et al.*, 2021) e *Dekkera bruxellensis* (CODATO *et al.*, 2018) de serem mais resistentes a meios estressantes. Logo, é importante levantar mais informações a respeito desses microrganismos.

Neste sentido, esse trabalho objetivou a avaliação de duas rotas de hidrólise de resíduos de alimentos provenientes de refeitórios: uma ácida, usando ácido sulfúrico; e outra enzimática, com diferentes coquetéis enzimáticos e misturas de enzimas. O efeito da extração da fração lipídica dos RA e a possibilidade de recircular o ácido sulfúrico utilizado na hidrólise ácida foram também avaliados. A fermentabilidade de hidrolisados de RA foi avaliada em cultivos anaeróbicos com diferentes leveduras, incluindo *S. cerevisiae* industrial e alterada geneticamente por indução de estresse; *D. bruxellensis* e *M. caribbica*, visando obter bioetanol como produto principal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de bioetanol a partir do uso de resíduos de alimentos (RA) provenientes de refeitórios.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização química completa dos RA a fim de identificar o potencial para a geração de açúcares fermentescíveis;
- Avaliar o papel de celulasas, amilases e sua mistura sobre a liberação de açúcares fermentescíveis a partir de RA;
- Estudar os efeitos do tempo, temperatura, concentração de ácido sulfúrico e carga de sólidos sobre a liberação de açúcares via hidrólise ácida de RA;
- Avaliar o impacto da remoção de lipídios dos RA sobre a digestão enzimática e ácida;
- Verificar a viabilidade de reciclar a fase líquida da hidrólise ácida para reduzir o consumo do ácido sulfúrico;
- Avaliar a fermentabilidade de hidrolisados enzimáticos e ácidos obtidos de RA;
- Comparar a produção de bioetanol a partir de RA entre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis* e *Meyerozyma caribbica*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 RESÍDUO SÓLIDO URBANO

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) (BRASIL, 2010), em seu art. 3º, inciso XVI define resíduos sólidos como:

“(...) material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d’água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível”.

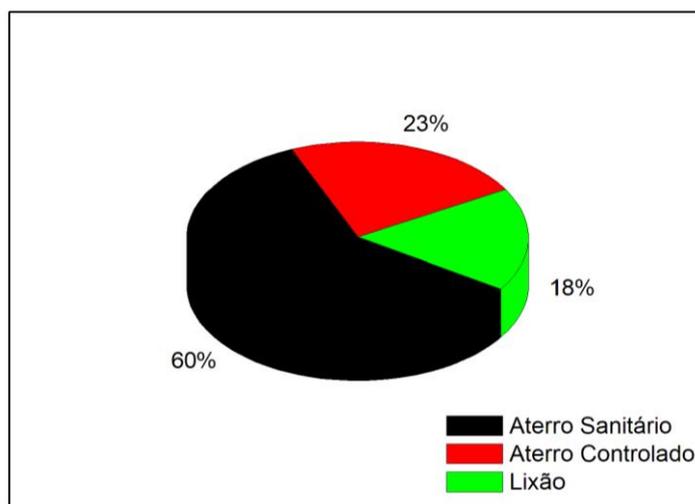
Assim, todo material descartado que não pode ser depositado no sistema de tratamento de esgoto é considerado resíduo sólido e, caso produzido por residências e pequenos comércios urbanos, recebe a denominação de Resíduo Sólido Urbano (RSU). No Brasil, a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE), expõe regularmente um panorama dos Resíduos Sólidos no país (ABRELPE, 2021).

O mais recente estudo publicado pela Abrelpe em 2021 mostrou que, no ano de 2019, 79 milhões de toneladas de RSU foram produzidas no país, das quais 72,7 milhões (92%) foram coletadas. A coleta, no entanto, não significa necessariamente destinação correta, pois apenas 59,5% dos resíduos coletados (43,3 milhões de toneladas) foram depositados em aterros sanitários (Figura 1). Somando-se os RSU não coletados com aqueles depositados incorretamente, 35,7 milhões de toneladas sofreram destinação ambiental incorreta no ano de 2019.

O Nordeste está em uma situação mais crítica quanto à coleta de RSU, uma vez que a região apresentou o menor índice de cobertura de coleta demonstrado no panorama nacional, como pode ser visto na Figura 2. Com uma geração de 53.975 toneladas em 2018, apenas 81,1% (43.774 toneladas) foram coletadas, das quais, em torno de 60% foram depositadas em aterros controlados e lixões, disposição que tende a causar impactos ambientais negativos, como apresentado posteriormente. O Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) estima que, em 2019, foram coletados 2,37 milhões de toneladas de RSU em Pernambuco (BRASIL, 2020),

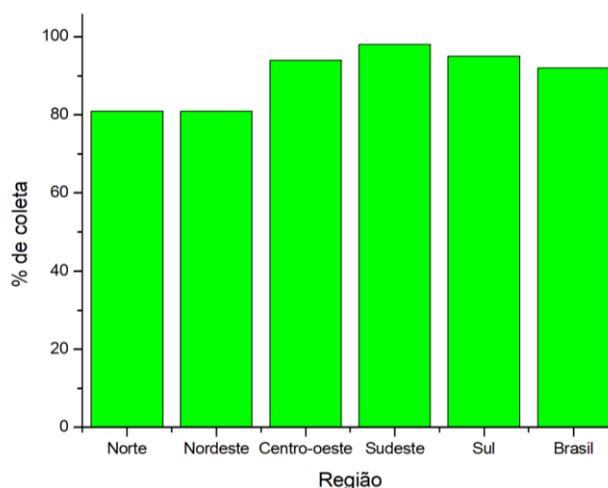
o que, conforme a Abrelpe, corresponde a 74% do que foi gerado no estado. Ainda segundo o SNIS, o município de Recife coletou aproximadamente 870 mil toneladas de RSU em 2019.

Figura 1 – Disposição final do Resíduo Sólido Urbano (RSU) coletado no Brasil em 2019.



Fonte: Abrelpe (2021)

Figura 2 – Índice de coleta de Resíduo Sólido Urbano (RSU), em 2019, por região do Brasil.



Fonte: Abrelpe (2021)

Os RSU são compostos de materiais secos e molhados, possuindo frações orgânicas e inorgânicas. No Brasil, os dados oficiais mais recentes de composição gravimétrica desse resíduo são listados também no Panorama da Abrelpe, relatando

uma composição média de 45,3% de materiais orgânicos; 16,8% de plástico; 14,1% de rejeitos; 10,4% de papel e papelão; 5,6% de têxteis, couros e borrachas; 2,7% vidro; 2,3% de metais; 1,4% de embalagens multicamadas e 1,4% listados como outros. Por outro lado, em Pernambuco, essa composição média é de 56,5% de material orgânico, 25,7% de recicláveis (11,1% de plásticos, 8,9% de papel, 3,1% de metal e 2,7% de vidro) e 17,8% de rejeitos (ITEP, 2012). De acordo com Alcântara (2007) quanto mais desenvolvida uma região, menor a porcentagem de resíduos orgânicos gerados pela população, a qual tende a consumir mais produtos industrializados, havendo uma alta porcentagem de recicláveis nos RSU analisados. Enquanto que populações de classes econômicas desfavorecidas chegam a apresentar 70% de seus resíduos como orgânicos. A informação é sustentada pelo relatório do banco mundial *What a Waste 2.0*, o qual informa que em países de renda alta, apenas 32% do resíduo é de matéria orgânica, já em países de renda média e baixa, esses valores são de 53 e 56%, respectivamente (KAZA *et al.*, 2018).

### 3.2 RESÍDUOS DE ALIMENTOS

De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), uma fração importante da matéria orgânica é composta de resíduos de alimentos (RA), sendo essa matéria responsável por 25,9 a 66,1% do volume total dos RSU (IPCC, 2019). A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que 33% de todo alimento produzido no mundo é perdido ou desperdiçado, um valor que ultrapassa 1,3 bilhões de toneladas por ano (GUSTAVSSON *et al.*, 2011). Não há, até o momento, dado oficial sobre a porcentagem de RA nos RSU no Brasil. Contudo, em 2018, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) realizou um estudo sobre desperdício de alimentos nas residências brasileiras, estimando-se que uma família de 3 pessoas, produza, em média, 128,8 kg de RA por ano (PORPINO *et al.*, 2018).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019) diferencia a origem dos resíduos de alimentos em dois grupos: perda e desperdício. A primeira definição trata de todos os resíduos que são gerados na cadeia produtiva, principalmente nas etapas de produção, pós-colheita, armazenamento e transporte. Já o desperdício acontece quando alimentos ainda úteis são descartados após contato com o consumidor final. Da Câmara *et al.* (2015) apresentam problemas nas centrais de distribuição de alimentos (CEASA), onde

alimentos são machucados devido ao transporte e, por estética, são descartados. Dados da FAO (2019) indicam que 14% dos alimentos são desperdiçados no mundo, gerando perdas econômicas, impactos sociais e impactos ambientais negativos.

Giroto, Alibardi e Cossu (2015) defendem que ambos os processos, perda e desperdício, devem ser contabilizados, pois o despejo de resíduos de alimentos acontece durante toda a cadeia produtiva, o que inclui o uso pelo consumidor final. Tchobanoglous e Kreith (2002) classificam a geração de resíduos em oito categorias: residencial, comercial, institucional, construção e demolição, serviços municipais, estações de tratamento, industrial e agricultura. Desses, apenas as estações de tratamento não produzem resíduos alimentares.

Outra classificação de perdas e desperdícios é citada por Ojha *et al.* (2020). Os autores dividem a cadeia de processos “da fazenda ao garfo”, em produção, pós-colheita, processamento, distribuição e consumo. Em cada uma das etapas há diferentes formas de geração de RA, as quais podem ser classificadas em evitáveis, possivelmente evitáveis, ou inevitáveis. Como observado na Figura 3, a maior parte dos processos pertencem aos dois últimos grupos.

Figura 3 – Perda e desperdício de alimentos pela cadeia produtiva e de consumo.



Fonte: Ojha *et al.* (2020)

Apesar de existir uma crescente preocupação com o desperdício alimentar e a conscientização da população, dificilmente a sociedade alcançará uma geração zero desse resíduo, dado que algumas perdas e desperdícios não são evitáveis. Além disso, estima-se que a geração de resíduos sólidos no mundo aumentará dos 2,01 bilhões de toneladas atuais para 3,40 bilhões de toneladas anuais em 2050 (KAZA *et al.*, 2018). Embora se estime que haverá uma melhoria econômica dos países e com isso a redução de resíduos orgânicos, essa biomassa ainda será produzida em larga escala.

### 3.3 IMPACTOS AMBIENTAIS DOS RESÍDUOS DE ALIMENTOS

O setor alimentício é responsável por cerca de 1/3 das emissões de gases de efeito estufa (GEE) no mundo (FLANAGAN; PRIYADARSHINI, 2021). A produção de alimentos utiliza insumos – terra, água, energia, fertilizantes, capital humano e financeiro – que são desperdiçados junto com o resíduo alimentar.

A matéria orgânica é putrescível, isto é, é facilmente decomposta por microrganismos na natureza. A decomposição gera GEE - metano (CH<sub>4</sub>) em anaerobiose, e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em aerobiose - além de vapor de água e traços de outros gases, como ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) (TCHOBANOGLIOUS; KREITH, 2002). Quando essa biomassa é levada à queima, além dos já citados gases, óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) são também liberados, os quais além do efeito estufa são promotores da chuva ácida (FERNANDES; MAZZOLA; OLIVEIRA JÚNIOR, 2016).

Tchobanoglous e Kreith (2002) relatam os problemas causados também pela fração líquida que se desprende do lixo, líquido percolado popularmente denominado chorume. Caso os resíduos alimentares estejam com pesticidas e/ou fertilizantes, esses podem contaminar solos e lençóis freáticos. Logo, os aterros sanitários, por controlarem essa produção e tratarem esse efluente, são considerados os locais mais ambientalmente adequados para deposição final dos resíduos.

Contudo, os aterros sanitários causam impactos ambientais consideráveis. Para sua implantação é necessária uma área extensa, a qual deve passar por um processo de impermeabilização e, após completar sua vida útil (entre 15 e 20 anos), deve ser transferido para outra área (ALCÂNTARA, 2007). Gomes *et al.* (2015) avaliaram o impacto ambiental de aterros sanitários antes e após o processo de

compostagem, avaliando o potencial de aquecimento global, a redução de recursos naturais não renováveis, a alteração da qualidade do solo e águas e a geração de resíduos finais. Através da Análise do Ciclo de Vida (ACV) do aterro, os autores definiram pontos, classificando os parâmetros em intolerável, sério, moderado, tolerável, menor e isento. No cenário sem a compostagem, observaram que 22,2% dos critérios foram classificados em intoleráveis ou sérios, com a compostagem esse valor ficou em 17,6%. Observa-se que, apesar da diminuição dos impactos ambientais com a compostagem, ainda há potenciais riscos nos aterros.

Uma alternativa bastante utilizada quando não há disponibilidade de áreas para aterro sanitário é a incineração. O processo, entretanto, tem alto custo, principalmente pelo alto teor de umidade presente nos resíduos, além de emitir dioxinas e metais pesados, que devem passar por tratamento com filtros (PHAM *et al.*, 2015). Uma análise de ACV de seis diferentes plantas de incineração na China, demonstrou que há altas emissões de GEE nesses locais (YANG *et al.*, 2012). O estudo demonstra que as emissões podem ser mitigadas ao se reduzir o conteúdo de plásticos e de resíduos alimentares nessas unidades, aumentando ainda a eficiência e o poder calorífico inferior (PCI) do material a ser incinerado.

### 3.4 APROVEITAMENTO QUÍMICO E ENERGÉTICO DE RESÍDUOS DE ALIMENTOS

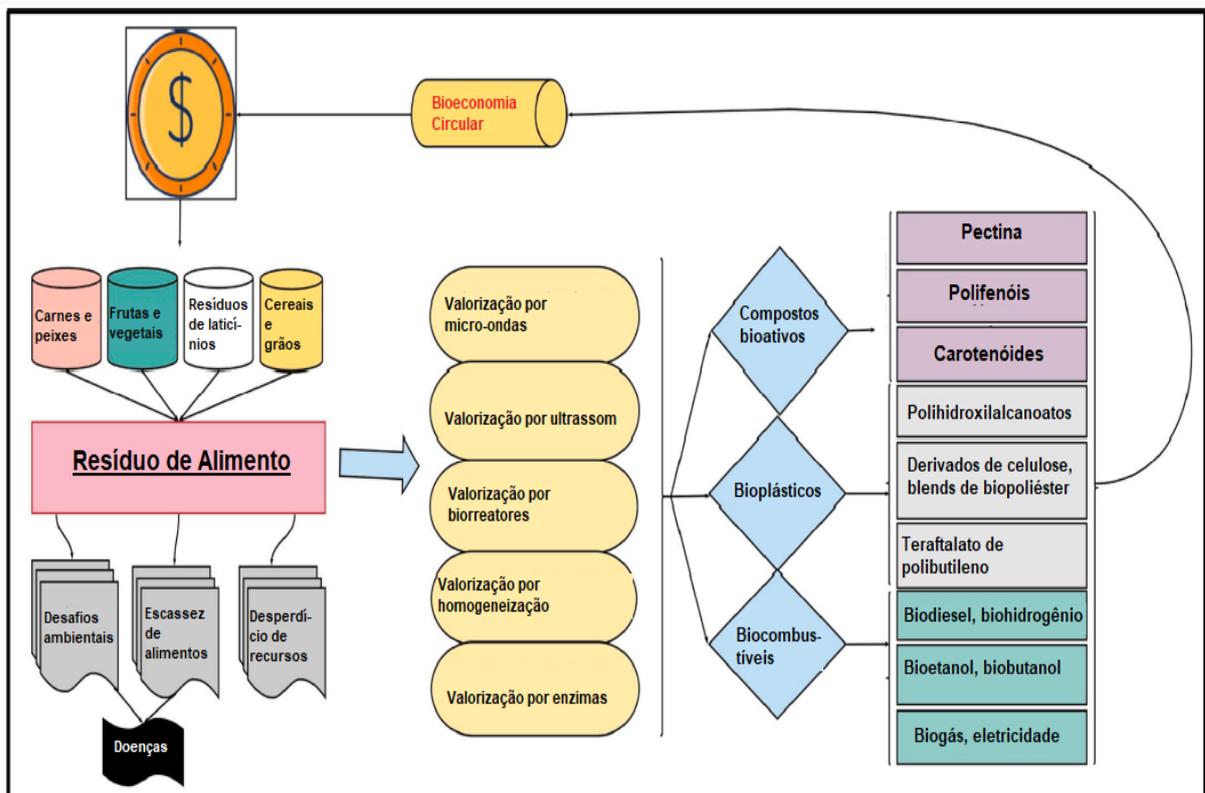
A composição de RA é bastante complexa. Ao se analisar a gravimetria, observa-se que há desde frutas e verduras até ossos e carnes nessa biomassa (KARMEE, 2016). Essa variedade de materiais, que torna a biomassa bastante heterogênea, é dependente da base alimentar da residência, restaurante ou região analisada. Todavia, independentemente do local de estudo, esse resíduo contém lipídios, carboidratos, proteínas, cinzas, lignina, aminoácidos, fosfatos, vitaminas e extrativos (ceras e carboidratos de baixo peso molecular) (MATSAKAS *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2021).

O principal carboidrato presente em resíduos de alimentos, em geral, é o amido. Entretanto, também há concentrações consideráveis de celulose, hemicelulose e pectina (MATSAKAS *et al.*, 2014; ALAMANOU *et al.*, 2015). Além dos carboidratos, há a presença de lignina, uma macromolécula presente em estruturas

vegetais, a qual tem como principal característica proteger as células de ataques externos, logo, possui grande recalcitrância (ZABED *et al.*, 2017).

Essa riqueza de compostos torna o RA uma matéria-prima para diferentes produtos, conforme pode ser observado na Figura 4. Assim, a biomassa de resíduos alimentares possui um enorme potencial para integrar uma bioeconomia circular, com a redução de custos ambientais, sociais e econômicos, o crescimento da competitividade econômica e redução da pobreza e da fome (SHARMA *et al.*, 2021).

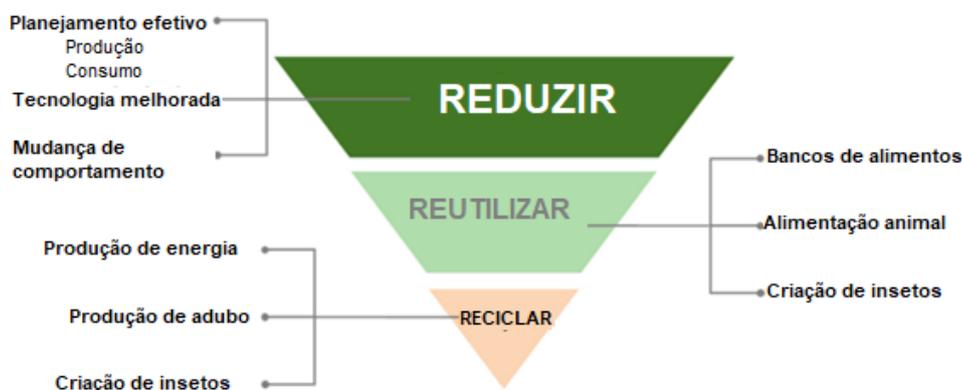
Figura 4 – Esquema representativo do conceito de bioeconomia circular através da valorização de resíduo de alimento.



Fonte: Sharma *et al.* (2021)

Brasil (2010) apresenta como um dos objetivos da Política Nacional de Resíduo Sólidos (PNRS) a reutilização dos resíduos e cita que eles devem ter seu máximo potencial aproveitado. Ojha *et al.* (2020) apresentaram a estrutura do conceito de redução, reuso e reciclagem de RA (Figura 5). Nos aterros sanitários, há a produção de biogás, contudo de forma não controlada e apresentando digestão aeróbica (menos eficiente). Portanto, o gás gerado perde em qualidade, além de que, em muitos casos é queimado (ALCÂNTARA, 2007; PIÑAS *et al.*, 2016).

Figura 5 – Conceitos de reduzir, reusar e reciclar aplicados aos resíduos de alimentos.



Fonte: Ojha *et al.* (2020)

Karmee (2016) realizou uma revisão, apresentando um estado da arte sobre combustíveis líquidos produzidos na Ásia a partir do uso de RA. Conforme observado, as principais rotas tecnológicas empregadas são a pirólise, produzindo bio-óleo; e a hidrólise da biomassa com posterior separação de fases, uma rica em carboidratos, a qual é fermentada, e a outra rica em lipídios, a qual passa por um processo de transesterificação, produzindo biodiesel. Conforme cita o estudo, o bio-óleo ainda não tem produção industrial, sendo, entre os combustíveis citados, o menos eficiente. O uso de RA como substrato apresenta como principal vantagem o fato de ser uma matéria-prima sem custo, com elevada disponibilidade e que não compete com o uso de terras agricultáveis. A produção de biocombustíveis líquidos tem forte apelo ambiental, com redução de emissões de GEE e da dependência de combustíveis fósseis, garantindo maior segurança e diversificação energética nos países. Contudo, a produção ainda é cara e para RA não há, até o momento, um método de produção com custo-benefício aceitável, principalmente devido à complexidade encontrada na matriz dessa biomassa. Além disso, a maioria das pesquisas nesse assunto está em estágio inicial.

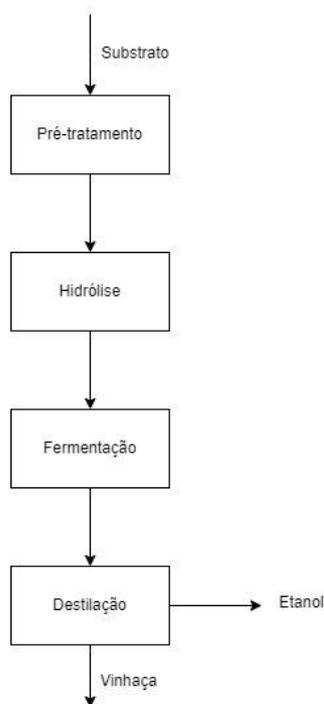
### 3.5 BIOETANOL

O bioetanol é considerado um dos mais importantes biocombustíveis da atualidade, devido a sua tecnologia ser bastante empregada e o *blend* etanol-gasolina ser bastante aceito, visto que melhora a octanagem do combustível derivado do petróleo, melhorando sua queima e reduzindo emissões de particulados. A produção

é mais concentrada nos Estados Unidos, pela hidrólise do amido presente no milho, e no Brasil com o uso da cana-de-açúcar como substrato (ALAMANOU *et al.*, 2015).

Apesar desse potencial, o bioetanol a partir dessas fontes sofre algumas críticas, principalmente com a preocupação de que exista uma disputa entre áreas de plantio para combustíveis e para a alimentação. Além disso, há uma preocupação com a segurança alimentar, visto que, por exemplo, o preço do milho, base alimentar de vários países em desenvolvimento, sofre com a volatilidade do mercado dos combustíveis (HAO *et al.*, 2017). Como uma maneira de se evitar essa disputa, bem como reaproveitar resíduos agroindustriais, diversas pesquisas focaram na produção do chamado etanol de 2ª geração, o qual provém de resíduos lignocelulósicos. Atualmente, há um potencial para a produção de bioetanol de 3ª e 4ª geração, os quais se baseiam, respectivamente no uso de microalgas e materiais geneticamente modificados com captura e armazenamento de carbono (ZABED *et al.*, 2017; ABDULLAH *et al.*, 2019). O processo básico de produção de bioetanol a partir de RA se assemelha ao de 2ª geração, apesar dessa biomassa não ser lignocelulósica. As etapas desse processo podem ser observadas na Figura 6 e serão detalhadas nas próximas seções.

Figura 6 – Fluxograma de produção de bioetanol de 2ª geração.



Fonte: Adaptado de Alamanou *et al.* (2015) e Huang *et al.* (2015)

### 3.5.1 Pré-tratamento

Ao avaliar a composição química de biomassas usuais para a produção de bioetanol, conforme a Tabela 1, é possível perceber que são compostas por macromoléculas, as quais não são acessíveis aos microrganismos fermentativos. Na Figura 6, observa-se que o pré-tratamento é a etapa inicial para melhorar a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, os quais posteriormente serão convertidos a bioetanol.

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol de segunda geração.

<b>Biomassa Lignocelulósica</b>	<b>Celulose %(m/m)</b>	<b>Hemicelulose %(m/m)</b>	<b>Lignina %(m/m)</b>
Madeira dura	50,8 – 53,3	26,2 – 28,7	15,5 – 16,3
Madeira Mole	45,0 – 50,0	25,0 – 35,0	25,0 – 35,0
Palha de trigo	35,0 – 39,0	23,0 – 30,0	12,0 – 16,0
Espiga de milho	33,7 – 41,2	31,9 – 36,0	6,1 – 15,9
Talo de milho	35,0 – 39,6	16,8 – 35,0	7,0 – 18,4
Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 – 19,0
Casca de arroz	28,7 – 35,6	12,0 – 29,3	15,4 – 20,0
Bagaço de cana	25,0 – 45,0	28,0 – 32,0	15,0 – 25,0
Palha de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0
Palha de cevada	36,0 – 43,0	24,0 – 33,0	6,3 – 9,8
Gramíneas	25,0 – 40,0	25,0 – 50,0	10,0 – 30,0

Fonte: Cai *et al.* (2017)

As biomassas lignocelulósicas, que são usadas na produção de etanol de 2ª geração, possuem como principal carboidrato a celulose. Na estrutura celular, esse polissacarídeo está presente em um emaranhado combinado com a lignina e a hemicelulose. A lignina é uma estrutura rígida de proteção, logo de difícil quebra, enquanto a celulose é um carboidrato cristalino, também com alta recalcitrância (ZABED *et al.*, 2017). Por esse motivo, os processos de pré-tratamento são fundamentais visando a desestruturação dessa matriz, a partir da solubilização da lignina e da diminuição da cristalinidade da celulose. Sun e Cheng (2002) realizaram uma vasta revisão sobre pré-tratamentos voltados ao bagaço de cana-de-açúcar, biomassa lignocelulósica mais utilizada, que englobam pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos.

Contudo, o principal carboidrato encontrado em resíduos de alimentos é o amido. Além disso, o teor de lignina é geralmente baixo, não sendo um impeditivo aos

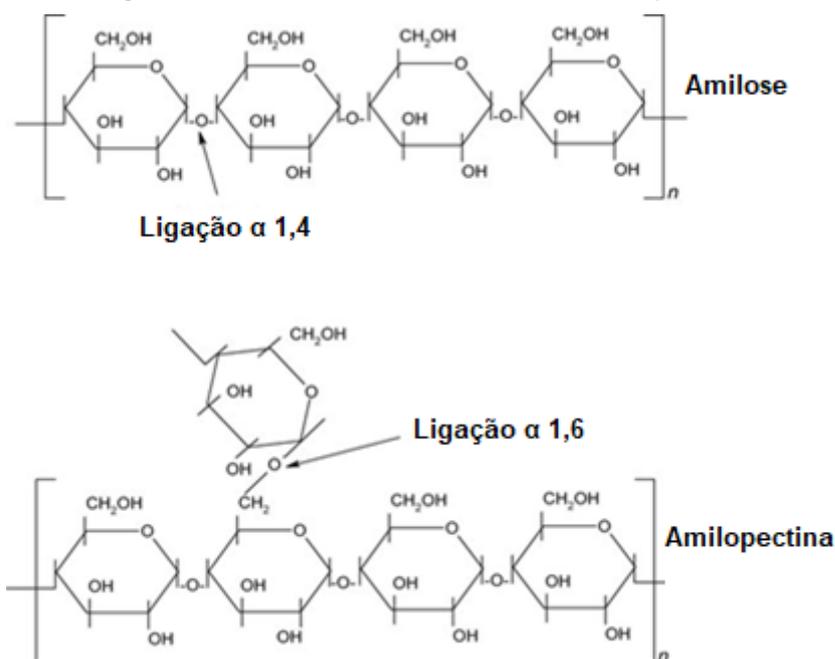
processos. O amido, ao contrário da celulose, possui baixa cristalinidade, sofrendo gelatinização a partir de temperaturas de cerca de 70°C (PRIMO-MARTÍN *et al.*, 2007). Nesse sentido, muitos autores realizam apenas a secagem ou a trituração dos resíduos de alimentos, antes de seguirem para a próxima etapa do processo (KIM; LEE; PAK, 2011; KIRAN; LIU, 2015; SUN; KOSAKI; WATANABE, 2020). Processos com microndas podem auxiliar a hidrólise do amido (ALAMANOU *et al.*, 2015). A extração de óleos e gorduras também foi empregada como pré-tratamento, a fim de se evitar ligações do amido e lipídios (TAHERI *et al.*, 2021). Matsakas *et al.* (2014) realizaram processos de liquefação/hidrólise enzimática de resíduos de alimentos domésticos e, após a fermentação, a biomassa residual foi pré-tratada hidrotermicamente, visto que a fração continha celulose não hidrolisada. O rendimento de etanol celulósico foi apenas 13% daquele obtido por via enzimática.

### 3.5.2 Hidrólise

O amido é um polissacarídeo composto de dois biopolímeros: amilose e amilopectina. Ambos são constituídos por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha$  1,4, porém a amilopectina possui também ligações do tipo  $\alpha$  1,6 (CAVALLINI; FRANCO, 2010), conforme mostrado na Figura 7. A estrutura desse carboidrato é semicristalina, com a fração de amilose amorfa. Desse modo, a sua recalcitrância tende a ser menor comparada àquela da celulose, por exemplo. O amido gelatinizado é hidrolisado mais rapidamente que o não processado (BLAZEK; GILBERT, 2010).

As principais enzimas amilolíticas são a  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. A primeira hidrolisa as ligações glicosídicas internas  $\alpha$  1,4 produzindo oligossacarídeos; já a segunda, hidrolisa as ligações  $\alpha$  1,4 e  $\alpha$  1,6 mais externas, liberando glicose no meio (PAZUR; ANDO, 1959). Zhang e Richard (2011) usaram amilases para a conversão do amido presente em RA, enquanto Matsakas *et al.* (2014) usaram complexos enzimáticos, com celulasas e glucoamilases para a hidrólise enzimática, apresentando maior eficiência.

Figura 7 – Estrutura do amido: amilose e amilopectina

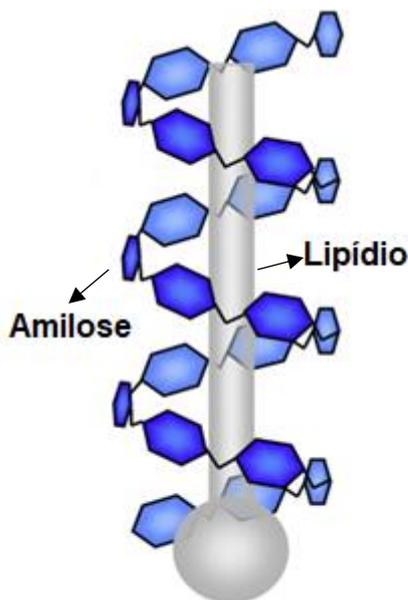


Fonte: Visakh *et al.* (2012)

Karmee (2016) discute que, para a produção de bioetanol, a etapa de hidrólise enzimática é a mais custosa, além de possuir altos tempos reacionais, atingindo, em alguns casos, 48 horas. A fim de tornar essa etapa mais econômica, Ma, Cai e Liu (2017) propuseram o uso de fungos do gênero *Aspergillus* para a produção de enzimas *in loco* nos resíduos alimentares, processo denominado CBP (*Consolidated Bioprocessing*), obtendo resultados similares ao uso de enzimas comerciais com mesma atividade.

A presença de lipídios pode ser um problema para a ação de enzimas. A amilose forma complexos semi-helicoidais com alguns tipos de lipídios, tornando a estrutura mais cristalina, conforme Figura 8. Nesse sentido, a digestão por amilases pode ser prejudicada, reduzindo-se a eficiência desse processo (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). Ai, Hasjim e Jane (2013) estudaram o efeito da adição de 10% (m/m) de diferentes tipos de lipídios em amidos de várias fontes. Os autores identificaram redução de eficiência de hidrólise enzimática em todos os casos analisados, sendo a mais drástica de 77,5% para 35,0%. Gundupalli *et al.* (2021) observaram que a extração de cera – material lipídico – da parede celular de vegetais aumenta em até 1,35 vezes a concentração de açúcares no meio hidrolisado.

Figura 8 – Estrutura semi-helicoidal da ligação entre amilose e lipídio

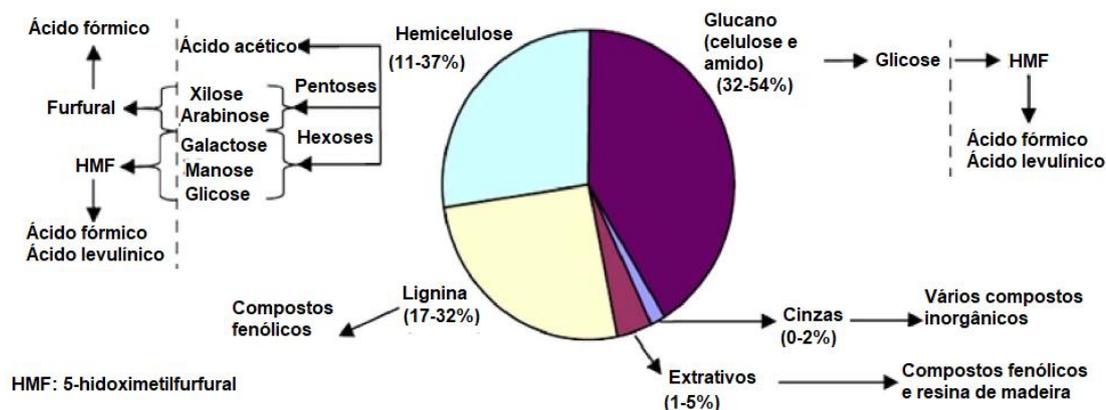


Fonte: Putseys, Lamberts e Delcour (2010)

Processos químicos também podem ser utilizados para hidrolisar os carboidratos, sendo mais rápidos que os enzimáticos. Sun e Cheng (2002) relataram os aspectos da hidrólise ácida, a qual pode ser concentrada ou diluída. Ácidos concentrados são úteis para hidrólise da celulose, porém são mais tóxicos e exigem reatores mais resistentes à corrosão (WIJAYA *et al.*, 2014). Nesse sentido, o uso de ácidos diluídos pode ser uma alternativa menos danosa. Durante o processo, íons  $H_3O^+$  são utilizados como catalisadores da reação (XIANG; LEE; TORGET, 2004).

O amido pode ser hidrolisado por processos ácidos. Todavia, pode haver formação de produtos tóxicos aos microrganismos fermentativos, como 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, os quais são formados a partir da degradação da glicose e das pentoses, respectivamente. Além disso, ácidos orgânicos, como ácido acético, fórmico e levulínico são originados da desidratação desses monossacarídeos (ZABED *et al.*, 2017). A Figura 9 apresenta os principais inibidores que podem ser formados durante o processo.

Figura 9 – Componentes bioquímicos de biomassa e potenciais inibidores de microrganismos fermentativos.



Fonte: Zabed *et al.* (2017)

Hafid *et al.* (2017) usaram RA da Malásia rico em carboidratos (>60% da composição total) para a produção de bioetanol. Os autores utilizaram rotas hidrotérmicas, ácidas e enzimáticas para esse fim. Obtiveram uma liberação de 50 g/L de açúcares ao utilizar ácido sulfúrico a 1% (v/v), 90 °C e 180 min. O teor de açúcares foi elevado para 103 g/L com uma hidrólise enzimática em sequência a ácida.

### 3.5.3 Fermentação

Com os açúcares redutores disponíveis no líquido, os microrganismos podem usá-lo como substrato para a fermentação. Durante o processo bioquímico, os monômeros, especialmente glicose, são convertidos em etanol, CO<sub>2</sub>, água e energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) (Equação 1).



A *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura empregada nessa etapa, pois já é amplamente usada nas usinas de etanol de 1ª geração. Apesar de ser convencionalmente usada e adaptada às condições industriais, essa levedura se utiliza apenas de hexoses como fonte energética, principalmente glicose e frutose. Portanto, os açúcares advindos da hemicelulose, em sua maioria pentoses, não são aproveitados (CHANDEL *et al.*, 2011). Em contrapartida, existem microrganismos, como a levedura *Kluyveromyces marxianus*, que podem usar a xilose e a arabinose

como substrato no processo de fermentação etanólica (RODRUSSAMEE *et al.*, 2011). Leveduras outrora consideradas contaminantes do processo de 1ª geração também têm sido utilizadas como culturas puras para a produção de etanol lignocelulósico, tais como a *Dekkera bruxellensis* (CODATO *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2016) e a *Meyerozyma caribbica* (SAEED *et al.*, 2021; SUKPIPAT *et al.*, 2017).

Além dos contaminantes citados, que podem ser gerados no processo de pré-tratamento e hidrólises químicas (HMF, furfural e ácidos orgânicos), os microrganismos podem ser afetados por outras condições do meio reacional. Saeed *et al.* (2018) identificaram que, para resíduos de alimentos, concentrações de NaCl acima de 4% inibem o crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae*, pois há grande formação de ácido láctico. Apesar de auxiliarem no crescimento de leveduras, altas concentrações de gorduras podem acarretar problemas de flutuação e transferência de massa, prejudicando as etapas de hidrólise e de fermentação (HAFID *et al.*, 2017). Lipídios de cadeia longa podem gerar estruturas vesiculares, que podem reter metabólitos importantes para as células, bem como a sua estrutura apolar pode ser nociva aos microrganismos (CARMONA-CABELLO *et al.*, 2020). Além disso, condições de temperatura, pH e concentrações de substratos devem também ser respeitadas para o melhor desenvolvimento do microrganismo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 FONTE DE RESÍDUOS DE ALIMENTOS

O RA utilizado foi coletado em setembro de 2020 na empresa Lógica Ambiental, que gere a Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) no bairro do Curado, localizado no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. A empresa coleta o resíduo de diferentes fontes, tais quais restaurantes, shoppings e centrais de distribuição de alimentos (CEASA). O material foi separado pela própria empresa, sendo identificado apenas como resíduo de refeitório. O material foi coletado já em estágio inicial de degradação, sendo possível notar a presença de feijão, arroz, macarrão, legumes, verduras e cascas de frutas. Uma única coleta foi realizada, devido a problemas logísticos. Logo, o estudo refere-se apenas a uma amostra desse RA.

O material foi transportado em bombona de plástico até a Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos (BERSO), localizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O resíduo foi inicialmente triturado em triturador de alimento (Triturador ½ HP, Franke). Cerca de 40 kg da amostra foi pesada em balança (AUY220, Shimadzu), separada, seca em estufa com circulação e renovação de ar (TE-394/1, Tecnal) a 65 °C (Figura 10) durante uma semana e, posteriormente triturada em moinho tipo Willey (TE-394/1, Tecnal), até atingir granulometria de 30 mesh (Figura 11). O material foi caracterizado em relação ao teor de lipídios, proteínas, solúveis em água, extrativos, glucano, lignina e cinzas, conforme procedimentos descritos na seção 4.5.

Figura 10 – Resíduos de alimentos de refeitórios adicionados à estufa para secagem a 65°C durante 1 semana.



Fonte: O autor (2022)

Figura 11 – Resíduos de alimentos obtidos após secagem e trituração em moinho tipo Willey até granulometria de 30 mesh.



Fonte: O autor (2022)

#### 4.1.1 Extração de Lipídios

A extração de lipídios foi realizada com o uso do solvente n-hexano (98,5% de pureza, Química Moderna) (NIELSEN, 2003). O processo foi realizado em Soxhlet (Sebelin TE-188, Tecnal), adicionando 150 mL de solvente e 80 g de biomassa seca. A extração foi realizada por aproximadamente 6 h, quando o solvente se apresentou translúcido.

#### 4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para a hidrólise enzimática, utilizaram-se três complexos enzimáticos diferentes, adquiridos junto a empresa Sigma-Aldrich, grupo Merck: Cellic CTec 2 – complexo enzimático de celulases para hidrólise de celulose;  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase – ambos complexos enzimáticos para hidrólise do amido, conforme discutido na seção 3.5.2. A atividade enzimática da celulase havia sido previamente determinada pelo grupo de pesquisa, com o valor de 270 FPU/mL (*Filter Paper Unit*), já para as amilases, usou-se o indicativo no fabricante, 500 U/mL para a  $\alpha$ -amilase e 260 U/mL para amiloglucosidase.

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer via agitação em mesa agitadora Shaker (TE-4200 INCUBADORA, Tecnal), durante 48 h, operando a 150 rpm com a temperatura de 55 °C, e com uso de tampão fosfato pH 6,0. O pH e a

temperatura foram escolhidos pois otimizam a ação das amilases (SAEED *et al.*, 2018). Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em duplicata e divididos em três grupos: na presença de celulases de Cellic Ctec2 (CEL), na presença de  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase (AM) e na presença de uma combinação das três enzimas (CEL + AM). O ensaio controle foi definido como a condição sem a adição de enzimas.

Os ensaios foram realizados com 10% (m/v) de carga de sólidos (biomassa). Para a celulase, usou-se uma relação de 10 FPU/g de biomassa, enquanto para as amilases, usou-se o valor intermediário de 50 U/g, identificado em diferentes estudos apresentados na revisão de Saeed *et al.* (2018). Alíquotas de 0,25 mL foram coletadas antes do experimento e após 24 h e 48 h de reação, onde a reação na alíquota parou ao adicionar o mesmo volume de NaOH 6,5 M. As amostras foram resfriadas e depois centrifugadas a 10000 rpm por 10 min em centrífuga (HT, MCD-2000). O sobrenadante foi coletado para análises de carboidratos. As diferentes condições (CEL, AM e CEL+AM) foram comparadas através de Análise de Variância (ANOVA) one-way, através do *software Origin 6.0*.

### 4.3 HIDRÓLISE ÁCIDA

#### 4.3.1 Planejamento Experimental

Para a hidrólise ácida foram realizados dois planejamentos experimentais fatoriais completos  $2^3$  com triplicata no ponto central, a fim de se verificar a influência dos seguintes fatores: tempo de reação, temperatura, concentração de ácido sulfúrico e concentração de sólidos.

O primeiro planejamento foi realizado mantendo-se constante a concentração de ácido sulfúrico, de 0,5% (v/v), valor definido de forma a evitar a formação de inibidores. Os fatores tempo, temperatura e carga de sólidos e seus respectivos níveis foram definidos observando outros estudos (HAFID *et al.*, 2017 e KIM *et al.*, 2018), e são apresentados na Tabela 2. Na Tabela 3 está descrita a matriz do planejamento, identificando-se os ensaios.

Tabela 2 – Níveis do planejamento experimental para a hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).

<b>Fator</b>	<b>Nível (-)</b>	<b>Nível 0</b>	<b>Nível (+)</b>
Tempo (min)	20	40	60
Temperatura (°C)	111	121	127
Carga de sólidos (% m/v)	5	10	15

Fonte: O autor (2022)

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental para a hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Carga de sólidos</b>
1	(+)	(+)	(-)
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(-)	(-)
4	(+)	(-)	(+)
5	(-)	(+)	(-)
6	(-)	(+)	(+)
7	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(+)
9 <sup>a</sup>	0	0	0
9B	0	0	0
9C	0	0	0

Fonte: O autor (2022)

Para o segundo planejamento, manteve-se constante a temperatura de 127 °C, e a concentração de ácido sulfúrico foi utilizada como fator. Para a variação da concentração de ácido sulfúrico foi usado como base o estudo de Hafid *et al.* (2017). Já para os fatores tempo e carga de sólidos, foram mantidos os níveis do planejamento anterior. Os níveis e a matriz do planejamento estão discriminados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Para ambos os planejamentos, as variáveis de respostas foram os teores de açúcares redutores (AR) e de açúcares redutores totais (ART). Os planejamentos experimentais foram tratados no *software Statistica 7.0*, através da Análise de Variância (ANOVA), gráficos de Pareto e superfícies de resposta, conforme sugerido por Calado e Montgomery (2003) e Rodrigues e Lemma (2014). Para a verificação do modelo, usou-se o teste-F da falta de ajuste.

Os ensaios foram realizados em autoclave horizontal de bancada com primeiro estágio de aquecimento por 10 min até 91 °C, segundo estágio por 10 min até 116 °C e resfriamento por 20 min (AB-19, Phoenix). As amostras foram pesadas e transferidas

para Erlenmeyers de 500 mL, sendo adicionado o ácido sulfúrico no volume calculado pela concentração de sólidos. Após o período de reação, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min, e a fração líquida foi utilizada para a análise de AR e ART. O ensaio de maior concentração de AR foi posteriormente realizado em duplicata. As melhores condições foram utilizadas no ensaio com o material desengordurado.

Tabela 4 – Níveis do planejamento experimental para a hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).

<b>Fator</b>	<b>Nível (-)</b>	<b>Nível 0</b>	<b>Nível (+)</b>
Concentração de ácido (% v/v)	0,5	1	1,5
Carga de sólidos (% m/v)	5	10	15
Tempo (min)	20	40	60

Fonte: O autor (2022)

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental para a hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).

<b>Ensaio</b>	<b>Conc. Ácido</b>	<b>Carga de sólidos</b>	<b>Tempo</b>
1	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(+)
3	(-)	(+)	(-)
4	(-)	(+)	(+)
5	(+)	(-)	(-)
6	(+)	(-)	(+)
7	(+)	(+)	(-)
8	(+)	(+)	(+)
9A	0	0	0
9B	0	0	0
9C	0	0	0

Fonte: O autor (2022)

Após a separação de fases, a fração sólida residual do melhor ensaio da hidrólise ácida foi hidrolisada com celulasas a fim de se avaliar uma maior conversão a açúcares fermentescíveis. O experimento foi realizado em triplicata com 10% (m/v) de carga de sólidos, 10 FPU/g, a 150 rpm e a 50°C, melhores condições para o complexo enzimático. Utilizou-se tampão citrato com pH 4,8. O experimento foi realizado durante 48 h, onde ao final foi analisada a concentração de AR.

### 4.3.2 Reciclo

A melhor condição identificada no planejamento experimental, aquela que proporcionou maiores concentrações de AR, foi utilizada para os experimentos de reciclo da fração líquida da hidrólise ácida. Os experimentos foram realizados com o RA não tratado e com o material desengordurado. Para a realização do experimento, após a hidrólise ácida, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min e a fração líquida foi utilizada para hidrolisar uma nova biomassa. Foram realizados 3 ciclos, em duplicata, analisando-se o volume final, o pH, os teores de AR e de ART após cada ciclo, além de realizar a caracterização da biomassa residual após cada ciclo.

## 4.4 FERMENTAÇÃO

Os hidrolisados enzimáticos (material não tratado e desengordurado) e primeiros e terceiros ciclos de hidrólise ácida (material não tratado e desengordurado) foram submetidos a ensaio de fermentabilidade com quatro cepas de leveduras, a saber: JP1 (*Saccharomyces cerevisiae* industrial), P6H9 (*Saccharomyces cerevisiae* adaptada para tolerar maiores teores de HMF) (da Silva-Filho *et al.* 2005), MC (*Meyerozyma caribbica*) e DB (*Dekkera bruxellensis*) (REIS *et al.*, 2016). Todas as cepas utilizadas vieram do banco de leveduras mantidos a -80 °C em culturas estoques com 20 % de glicerol.

Antes da fermentação, foi preparado meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) para crescimento das leveduras. Para cada 100 mL de meio, foram adicionados 2 g de peptona bacteriológica, 2 g de glicose e 1 g de extrato de levedura (SOUZA, 2011). Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave (AB-19, Phoenix) a 121 °C por 30 min. O crescimento de microrganismos ocorreu durante 5 dias, sendo o volume de YEPD dobrado a cada dia. Ao final, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado uma solução salina 0,9% (m/v) NaCl, até seu uso.

Os experimentos foram realizados em tubos Falcon estéreis de 15 mL, com volume útil de 10 mL e 10% (m/v) de carga de leveduras, em duplicata. O pH dos meios foram ajustados para 4,8 com NaOH 6,5 M. Os tubos foram mantidos na bancada do laboratório, em temperatura ambiente (25 – 30 °C) e estáticos. Os ensaios foram realizados durante 24 h, sendo coletadas amostras antes do início da

fermentação e após 5 h e 24 h de reação, sendo determinadas as concentrações de AR e etanol, conforme metodologias explicitadas na seção 4.5.

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 Teor de Umidade

A umidade do material foi calculada por diferença de massa. O material úmido foi seco em estufa com circulação e renovação de ar (TE-394/1, Tecnal) a 65°C até se obter massa constante. A umidade foi então determinada pela Equação 2.

$$Umida(\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} \cdot 100 \quad (2)$$

em que  $M_f$  é a massa final e  $M_i$  é a massa inicial.

### 4.5.2 Teor de Lipídios

O teor de lipídios foi quantificado através da metodologia de extração com n-hexano (98,5% PA, Química Moderna). Uma amostra de aproximadamente 80 g do material seco foi pesada em cartucho de celulose e acondicionada no aparelho extrator Soxhlet (Sebelin TE-188, Tecnal) (NIELSEN, 2003). Um volume de 150 mL de n-hexano foi adicionado durante 6 h. O teor de lipídios foi calculado conforme a Equação 3,

$$Lipídios (\%) = \frac{M_i - (M_f - M_c)}{M_i} \quad (3)$$

em que  $M_i$  é a massa de biomassa inicial,  $M_f$  é a massa final de biomassa e cartucho e  $M_c$  é a massa inicial do cartucho.

### 4.5.3 Teor de Proteínas

Para a determinação do teor de proteínas foi inicialmente calculado o teor de nitrogênio Kjeldhal (THOMAS; SHEARD; MOYER, 1967). Para a determinação de nitrogênio, 250 mg do material seco foram pesados, transferidos para um tubo de ensaio e adicionado 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% PA, Química Moderna). O tubo foi levado à placa digestora (040/25, Tecnal) a 350 °C por 30 min. Após 10 min fora da placa, foi adicionado 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (35% PA, Neon Comercial LTDA) e o tubo foi novamente colocado na placa por 8 minutos, retirado e deixado esfriar por mais 10 minutos. O processo de adição de peróxido foi repetido até a amostra ficar transparente, quando o tubo foi levado novamente a placa digestora por mais 30 minutos para evaporar todo o peróxido. A amostra resultante foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, com o volume completado com água destilada.

Após a etapa da digestão, prosseguiu-se a etapa da destilação. Foram pipetados 20 mL da amostra e colocados em tubo de ensaio, o qual foi acoplado ao aparelho de destilação de nitrogênio (TE-0363, Tecnal). Paralelamente, foram pipetados 10 mL de solução de ácido bórico (99,5% PA, Vetec Química Fina) com indicador em Erlenmeyer de 125 mL, e 10 mL de NaOH 13N no copo do destilador. A torneira foi aberta para que o hidróxido se misturasse com a amostra. O destilador foi ligado, destilando-se até completar um volume de aproximadamente 50 mL no Erlenmeyer.

O destilado, de coloração azul, foi titulado com HCl 0,0743 N até a mudança de cor para rosa escuro. O volume de HCl utilizado foi igual ao valor da porcentagem de nitrogênio na amostra. O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o nitrogênio pelo fator de 6,25.

### 4.5.4 Teor de Solúveis em Água

A concentração de solúveis em água foi determinada através de extração com Soxhlet (Sebelin TE-188, Tecnal). Uma amostra de aproximadamente 7,5 g de biomassa foi colocada em cartucho de celulose, e foi extraída com 150 mL de água destilada por aproximadamente 8h. O teor de solúveis em água foi calculado pela Equação 4.

$$\text{Solúveis em água (\%)} = \frac{M_i - (M_f - M_c)}{M_i} \quad (4)$$

em que  $M_i$  é a massa de biomassa inicial,  $M_f$  é a massa final de biomassa e cartucho e  $M_c$  é a massa inicial do cartucho.

#### 4.5.5 Teor de Extrativos

Os extrativos foram quantificados via extração por Soxhlet (Sebelin TE-188, Tecnal) com etanol 92 °GL, após a extração com água. A concentração de extrativos foi calculada pela Equação 5.

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{M_i - (M_f - M_c)}{M_i} \quad (5)$$

em que  $M_i$  é a massa de biomassa inicial,  $M_f$  é a massa final de biomassa e cartucho e  $M_c$  é a massa inicial do cartucho.

#### 4.5.6 Teores de Glucano, Hemicelulose, Cinzas e Lignina

Os teores de glucano (celulose e amido), hemicelulose, lignina e cinzas foram determinados segundo metodologia de Gouveia, Nascimento e Souto-Maior (2009), a qual é utilizada para materiais lignocelulósicos. Após a retirada de extrativos (sem a remoção de lipídios) e completa evaporação do etanol, 2 g do material foi hidrolisado com ácido sulfúrico 72% (v/v) durante 7 min, em banho termostático a 45°C com maceração constante. A reação foi interrompida com 50 mL de água destilada, completou-se o volume com 225 mL de água destilada em Erlenmeyer de 500 mL, o qual foi levado para autoclave de bancada (AB-19, Phoenix), durante 30 min a 121°C, para completa degradação dos polímeros.

Após o resfriamento do material, foi realizada a filtração em papel de filtro previamente seco e tarado (Quantitativo – preta; Ref. 41; retenção nominal de 20-25 micra). O hidrolisado foi coletado em balão volumétrico de 500 mL e o sólido foi lavado com água destilada até se atingir o volume do balão. O material sólido foi então lavado

com 1,5 L de água destilada para neutralizar o pH e seco em estufa com circulação e renovação de ar (TE-394/1, Tecnal) a 65°C por 24 h.

Para análise dos carboidratos e ácidos orgânicos, utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu com coluna Aminex HPX 87-H<sup>+</sup> com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol.L<sup>-1</sup>; fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>; temperatura do forno de 50°C e detector de índice de refração 35°C. Foram realizadas curvas dos padrões. Os teores de glucano e hemicelulose foram determinados pelos fatores de conversão, associados a estequiometria de hidrólise dos polissacarídeos (Tabela 6).

Tabela 6 – Fatores de conversão para caracterização de celulose e hemicelulose.

<b>COMPONENTE</b>	<b>FATOR DE CONVERSÃO</b>	<b>MOLÉCULA PRECURSORA</b>
Celobiose	0,95	Celulose
Glicose	0,90	Glucano
Xilose	0,88	Hemicelulose
Arabinose	0,88	Hemicelulose
Ácido Fórmico	3,09	Glucano
Ácido Acético	0,72	Hemicelulose

Fonte: Gouveia; Nascimento; Souto-Maior (2009)

O material residual no papel de filtro, após secagem foi pesado e levado para mufla (Forno Mufla 7000, EDG Equipamentos) para calcinação lenta, nas temperaturas de 150°C por 30 min, 500°C por 20 min e 800°C por 2h. A concentração de lignina insolúvel em meio ácido foi determinada pela Equação 6. A concentração de cinzas da biomassa foi determinada do mesmo modo.

$$Lignina (\%) = \frac{M_{is} - M_{cz}}{M_a} * 100 \quad (6)$$

em que  $M_{is}$  é a massa de lignina insolúvel seca,  $M_{cz}$  é a massa de cinzas e  $M_a$  é a massa da amostra seca.

#### 4.5.7 Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais

Os açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foram analisados pela metodologia do ácido 3,4-dinitrosalicílico (DNS), proposta por Miller (1959) e adaptada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013). Para a quantificação foi utilizado o reagente DNS. Para 100 mL do reagente, foram dissolvidos 1,0 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 50 mL de água destilada, sob agitação constante e em banho termostático com temperatura de 30 °C. Adicionou-se 20 mL de solução de NaOH 2 N, sob constante agitação até completa dissolução do ácido. Posteriormente, foram adicionados 30 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado (sal de Rochelle, Grupo Química, grau P.A. ACS). O volume foi completado para 100 mL. O reagente foi acondicionado em frasco âmbar em geladeira.

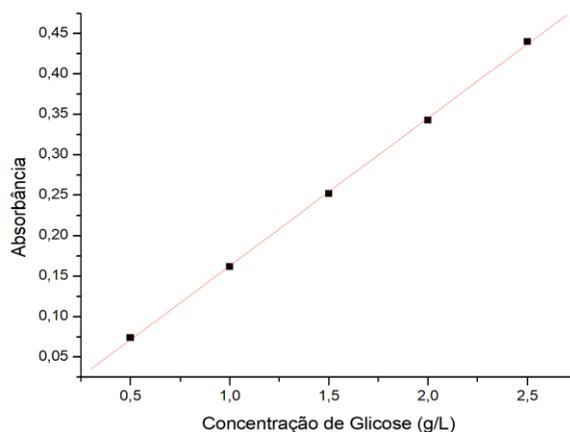
Com o reagente pronto, foi construída a curva de calibração, utilizando glicose anidra (Vetec Química Fina, grau P.A. ACS) como padrão. Foram preparadas soluções de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g/L de concentração de glicose. Prosseguiu-se a metodologia de AR, como citado acima, com as concentrações conhecidas, sendo determinado a absorvância. A curva de calibração mostrada na Figura 12 foi construída, obtendo-se a linha de tendência de regressão linear. O modelo linear, dado pela Equação 2, resultou em coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,998.

A amostra analisada foi diluída para que o valor se encaixasse na equação da reta de calibração do reagente. Uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi misturada com 1,5 mL de DNS. A solução reagiu durante 5 min em banho termostático (TE-056 mag, Tecnal) a 100°C. Após a reação, o material foi resfriado em banho de gelo e diluído com 20 mL de água destilada. O líquido foi levado para leitura em espectrofotômetro (SP-220, Biospectro) no comprimento de onda de 540 nm.

Para a determinação de ART, foi realizada previamente uma hidrólise com ácido clorídrico 2 N na proporção de 1:1 (v/v) com a amostra, durante 10 min a 100°C. Após a reação e resfriamento do meio reacional, o material foi neutralizado com

hidróxido de sódio 2 N, na relação 1:1 (v/v) com a quantidade de ácido adicionado. Prosseguiu-se a metodologia conforme descrito acima.

Figura 12 – Curva de calibração do reagente 3,5-dinitrossalicílico (DNS) para determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART).



Fonte: O autor (2022)

$$Y = 0,1826X - 0,0197 \quad (7)$$

em que,  $Y$  representa a absorbância e  $X$  se refere ao teor de AR (g/L).

#### 4.5.8 Teor de Etanol

A concentração de etanol nos meios fermentados foi quantificada através de CLAE, nas mesmas condições previamente descritas para a quantificação de carboidratos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO DE ALIMENTO

Os resultados da caracterização da amostra de RA do presente estudo (umidade, solúveis em água, carboidratos, proteínas, lipídios, cinzas e extrativos) foram comparados a resultados de outros estudos publicados para a produção de bioetanol, conforme mostra a Tabela 7. Os RA são, geralmente, bastante heterogêneos, sendo compostos por frutas e verduras, carnes, peixes, condimentos, folhas de chá, queijos, entre outros (KARMEE, 2016). Essa composição varia a depender do local e sazonalidade, principalmente com relação aos hábitos de consumo da população (DOU; TOTH, 2021). Nesse sentido, espera-se uma composição química complexa. Os autores que trabalham com a produção de bioetanol com RA costumam apresentar a concentração de carboidratos (totais, amido, celulose, hemicelulose e pectina), lipídios e proteínas (Tabela 7).

O RA avaliado neste estudo apresentou um alto teor de umidade (85%). Em outros trabalhos, os autores trabalharam com a biomassa previamente seca, obtendo uma umidade menor de 9,1% (TAHERI *et al.*, 2021). Contudo, o RA geralmente possui uma alta umidade, como observando por Huang *et al.* (2015), com uma umidade de 64% e por Carmona-Cabello *et al.* (2020), com umidade de 52 a 74%. Não foi possível, neste estudo, a separação entre amido e celulose. Por esse motivo, ambas foram quantificadas como glucano. Por terem o mesmo monômero formador (glicose), a separação entre esses polissacarídeos é dificultosa. Nesse sentido, foi identificado um teor de glucano de  $66,26 \pm 8,10$  %, próximo aos teores de carboidratos de estudos com outros RA (Tabela 7). Além disso o teor de polissacarídeos é similar ao encontrado em biomassas que já possuem produção industrial de bioetanol de 2ª geração. O bagaço de cana-de-açúcar possui cerca de 40% de celulose e 20% de hemicelulose, enquanto a palha de cana-de-açúcar possui 40% de celulose e 30% de hemicelulose (CAI *et al.*, 2017).

Em relação ao teor de lipídios, a biomassa deste estudo se apresenta semelhante as de Taheri *et al.* (2021), os quais observaram que a extração dessa fração é benéfica para a produção de bioetanol. Observa-se, além disso, um alto teor de proteínas (22,85%), o qual é superior à de outros autores (MATSAKAS *et al.*, 2014; ALAMANOU *et al.*, 2015), mas se assemelha aos teores identificados por Hafid *et al.*

(2015) e Kim *et al.* (2018). A presença de proteínas é importante para o crescimento de microrganismos, por ser fonte de nitrogênio. Além disso, o material proteico pode ser reutilizado de outras maneiras, como em ração animal e em crescimento de insetos (OJHA *et al.*, 2020).

A lignina é um componente de alta recalcitrância e que compete com a adsorção de enzimas nos polissacarídeos. Logo, é comumente identificada como um impeditivo ao processo de produção de bioetanol (ZABED *et al.*, 2017). Todavia, conforme analisado, o RA possui apenas  $2,77 \pm 0,31\%$  de lignina, similar ao reportado em outros estudos (Tabela 7). Portanto, esse baixo teor de lignina facilita a hidrólise dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Nesse sentido, esse resíduo possui uma tendência de ser mais facilmente processado que os lignocelulósicos, os quais podem conter até 30% de lignina (CAI *et al.*, 2017).

Tabela 7 – Composição química de resíduo de alimento deste estudo e de estudos anteriores.

Componente	Concentração (% bs*)						
	Este estudo	MATSAKAS et al. (2014) e ALAMANOU et al. (2015)	HUANG et al. (2015)	HAFID et al. (2017)	KIM et al. (2018)	CARMONA-CABELLO et al. (2020)	TAHERI et al. (2021)
Umidade	85	ND	64	ND	ND	52,1 - 73,9	9,1 ± 0,1
Solúveis em H <sub>2</sub> O	40,87 ± 0,27	33,81 ± 0,42	ND	ND	ND	ND	35,0 ± 1,9
Carboidratos totais	ND	ND	ND	60,78 ± 2,02	ND	14 - 20	ND
Glucano**	66,26 ± 8,10	ND	ND	ND	23,1 ± 0,8	ND	ND
Amido	ND	ND	63,5	ND	ND	ND	9,4 ± 0,2
Celulose	ND	18,30 ± 0,19	ND	ND	ND	ND	9,0 ± 0,3
Hemicelulose	ND	7,55 ± 0,39	ND	ND	ND	ND	9,4 ± 0,2
Pectina	ND	3,92 ± 0,33	ND	ND	ND	ND	ND
Lignina insolúvel	2,77 ± 0,31	2,16 ± 0,25	ND	ND	ND	ND	ND
Lipídios	11,78 ± 0,24	11,91 ± 0,68	4,1	13,65 ± 1,74	ND	7,2 - 11,8	11,7 ± 0,4
Proteínas	22,85 ± 1,97	10,51 ± 0,37	13,9	20,53 ± 1,77	21,5 ± 1,0	4,6 - 11,4	13,5 ± 0,4
Cinzas	8,63 ± 0,80	11,03 ± 0,42	3,4	ND	16,6 ± 0,5	1,3 - 2,6	13,2 ± 0,3
Extrativos	10,74 ± 0,45	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\*bs = base seca

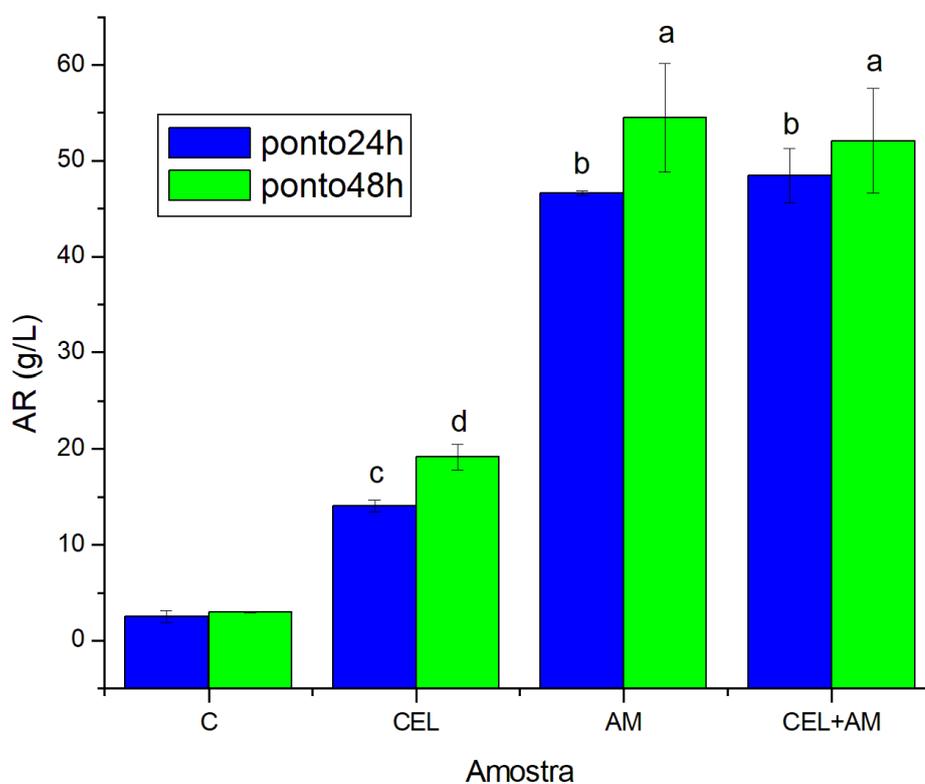
\*\*glucano = celulose e amido

ND = Não determinado

## 5.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi realizada para o resíduo de alimento não tratado e desengordurado. Considera-se que a biomassa não tratada é aquela que não passou pelo processo de remoção de gordura. Os resultados para a biomassa não tratada estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, após hidrólise enzimática, com diferentes complexos enzimáticos, de resíduo de alimento (RA) não tratado, a 55 °C, 150 rpm, pH 6,0 e 10% de sólidos. C = controle, CEL = cellic CTec 2, AM =  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, CEL + AM =  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase e cellic CTec2. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança



Fonte: O autor (2022)

Como observado, no controle C (sem presença de enzimas), há uma pequena concentração de açúcares, que variou entre 2,70 – 2,94 g/L no processo. Observa-se, no início do processo, concentração de açúcares para todos os coquetéis enzimáticos, sendo a concentração de amilases a maior,  $22,80 \pm 1,62$  g/L. Esses açúcares possivelmente estavam presentes nas enzimas utilizadas. Assim, para as amilases AM, a concentração de AR, obtida após 48 h, foi de  $54,50 \pm 5,68$  g/L, ou seja, uma

produção de  $33,33 \pm 6,38$  g/L de açúcares redutores, em média, ao se descontar o controle e o valor antes do início da hidrólise ( $22,80 \pm 1,62$  g/L). O ART foi calculado para os pontos finais, sendo obtido, para o experimento com amilases,  $31,82 \pm 3,09$  g/L, e para CEL + AM  $35,08 \pm 3,34$  g/L já descontados o controle e a concentração antes da hidrólise.

Não houve diferença significativa, para um nível de 95% de confiança, entre os valores de AR e ART. Logo, é inferido que o amido solubilizado foi convertido a glicose, não restando oligômeros no meio líquido. Não houve também diferença significativa, para um nível de 95% de confiança, entre os resultados, tanto de AR quanto de ART, entre as hidrólises realizadas com amilases e o CEL + AM. Logo, entende-se que as condições empregadas no estudo favoreceram a ação de amilases em detrimento das celulasas, conforme pretendido, com possível inibição das celulasas pela glicose liberada pelas amilases (HSIEH *et al.*, 2014), pois houve liberação de açúcar nos ensaios apenas com celulasas. Como é suposto que a maior parte dos carboidratos é de amido, favorecer a sua hidrólise é mais interessante. Além disso, há redução de gastos no processo ao não se utilizar enzimas celulolíticas. Assim, a fração líquida do hidrolisado com amilases foi posteriormente fermentada, conforme resultados apresentados na seção 5.4.

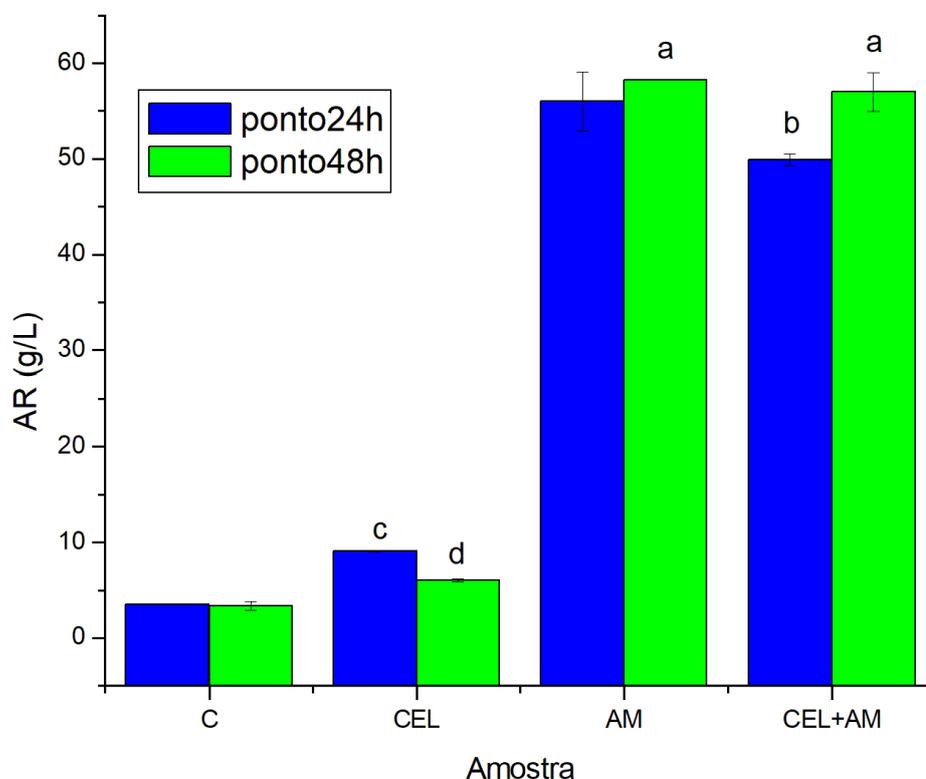
Para os experimentos de hidrólise, foram utilizados 1,5 g de resíduo de alimento, de modo que o material continha 0,99 g de glucano (66,26 %). Como o volume reacional foi de 15 mL, a concentração de glucano era de 66,26 g/L. O glucano corresponde a amido e celulose e 1 g desses carboidratos contém 1,11 g de glicose (GOUVEIA; NASCIMENTO; SOUTO-MAIOR, 2009). Logo a concentração máxima esperada de glicose era de 73,55 g/L. Com a produção de AR de 33,33 g/L, a hidrólise atingiu 45,32 % de eficiência, com um rendimento de AR de 0,33 g/g de biomassa.

Ao se comparar o resultado obtido neste estudo com outros, observa-se uma menor eficiência. O trabalho realizado por Kim, Lee e Pak (2011) usando carboidrases, glucoamilases, proteases e celulasas, obteve uma produção de 0,83 g de glicose/g de resíduo de alimento (RA). Alamonou *et al.* (2015) realizaram sacarificação com celulasas e  $\beta$ -glucosidase em RA. Usando carga de sólidos de 20% e 10 FPU/g de enzima, após pré-tratamento com micro-ondas, os autores obtiveram uma eficiência de 45%. Taheri *et al.* (2020) obtiveram uma eficiência de 90% usando enzimas semelhantes às deste estudo. Os autores realizaram uma extração prévia de

lipídios e realizaram hidrólises simultâneas do material, primeiramente com amilases e, depois, com celulases.

A fim de se observar o efeito da fração lipídica na hidrólise enzimática, o material foi desengordurado através de extração com hexano. O processo de hidrólise foi repetido, nas mesmas condições utilizadas para o RA não tratado. A Figura 14 apresenta os resultados de AR para 24 e 48 h.

Figura 14 – Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, após hidrólise enzimática, com diferentes complexos enzimáticos, de resíduo de alimento (RA) desengordurado, a 55 °C, 150 rpm, pH 6,0 e 10% de sólidos. C = controle, CEL = cellic CTec 2, AM =  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, CEL + AM=  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e cellic CTec 2. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança



Fonte: O autor (2022)

Como observado no material não tratado, há açúcares presentes no controle e no material com enzimas. Para a hidrólise apenas com amilases, a produção média após 48h, descontando o açúcar inicial ( $18,03 \pm 6,15$  g/L) e o controle, foi de  $36,8 \pm 5,7$  g/L. Valor 10,4% maior do que o obtido sem realizar a extração de lipídios. Contudo, não houve diferença significativa, para um nível de 95% de confiança, entre

os valores obtidos. Como os resultados se mostraram estatisticamente semelhantes, através da análise ANOVA *one-way*, não se pode afirmar essa melhoria de eficiência.

Logo, infere-se que a extração de lipídios não altera o processo, diferente do observado por Taheri *et al.* (2020). Os autores trabalharam com uma biomassa com conteúdo semelhante de lipídios a estudada ( $11,7 \pm 0,7\%$ ) neste trabalho, porém com menor teor de carboidratos totais ( $26 \pm 0,8\%$ ), indicando que o fator de impedimento para hidrólise enzimática é a relação entre carboidrato e lipídio ao invés da concentração de lipídio.

Os valores de ART obtidos após 48 h foram de  $40,05 \pm 0,00$  g/L para AM e  $40,08 \pm 0,04$  g/L para CEL + AM, já descontados o controle e o ponto 0 h, não havendo diferença estatística entre ambos a um nível de 95% de confiança. Além disso, não houve diferença significativa, para um nível de 95% de confiança, entre AR e ART, de modo que tanto para o hidrolisado não tratado quanto para o desengordurado, infere-se que não há mais oligômeros presentes no meio líquido. O hidrolisado com amilases foi então submetido ao teste de fermentabilidade, conforme discutido na seção 5.4.

### 5.3 HIDRÓLISE ÁCIDA

#### 5.3.1 Planejamento Experimental com Concentração de Ácido Constante

Inicialmente, foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com triplicata no ponto central mantendo-se a concentração de ácido sulfúrico constante (0,5% v/v). Os resultados de AR e ART podem ser visualizados na Tabela 8. Observou-se que o maior valor para a resposta concentração de açúcares redutores (AR = 32,19 g/L) e açúcares redutores totais (ART = 63,96) foi o ensaio 2, com 1 h de duração, operando a 127 °C e com 15% (m/v) de sólidos. A fim de se aumentar a disponibilidade de carboidratos fermentescíveis, buscou-se hidrolisar o resíduo sólido desse processo. As frações líquidas e sólidas foram separadas por centrifugação. Usou-se o complexo enzimático Cellic CTec 2 – composto em sua maioria por celulasas – para realizar essa nova hidrólise. Usando-se as condições ótimas para essa enzima (50 °C, 10% m/v de sólido, 150 rpm e pH 4,8), obteve-se apenas 10 g/L de AR no meio líquido. Valor bem aquém do obtido na hidrólise ácida e na hidrólise enzimática do material

não tratado. Desse modo, foi dada sequência aos experimentos apenas com o hidrolisado ácido.

Tabela 8 – Variáveis de resposta do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (° C)	Carga de sólidos (% m/v)	AR (g/L)	ART (g/L)
1	60	127	5	34,96	30,06
2	60	127	15	32,19	63,96
3	60	111	5	6,63	14,13
4	60	111	15	9,51	41,78
5	20	127	5	17,54	15,62
6	20	127	15	19,58	49,51
7	20	111	5	7,74	13,13
8	20	111	15	14,38	60,72
9A	40	121	10	17,98	19,36
9B	40	121	10	17,65	26,09
9C	40	121	10	15,93	25,34

Fonte: O autor (2022)

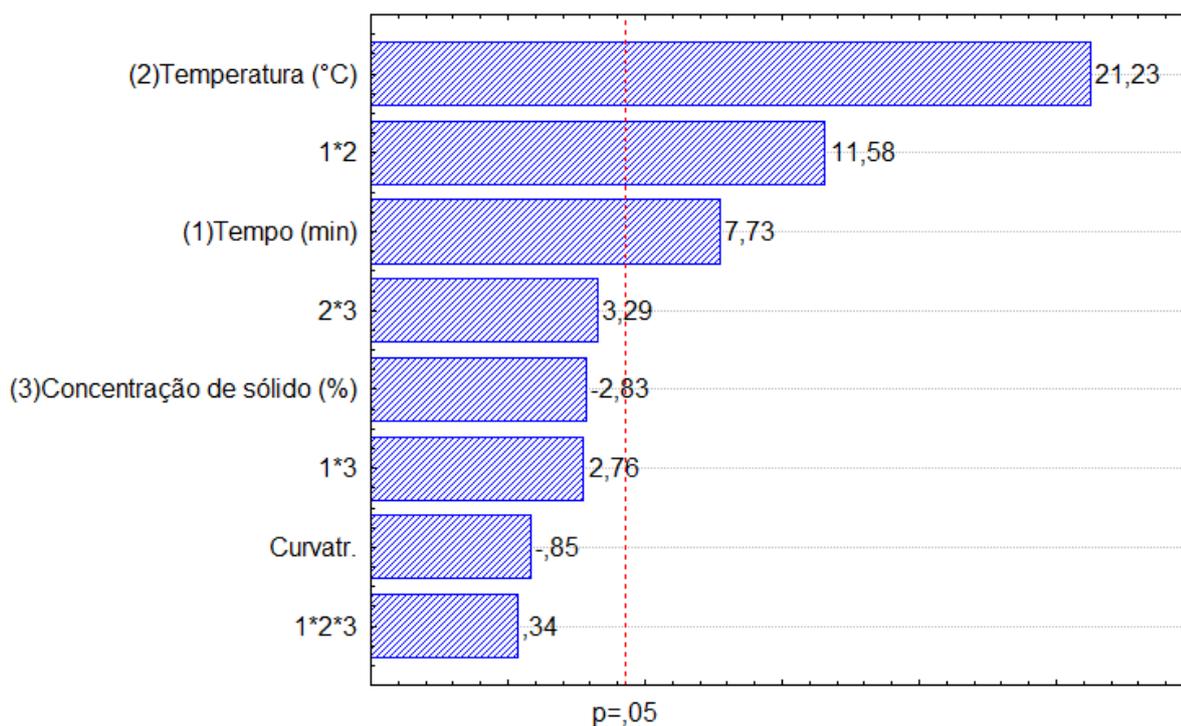
Apesar da alta concentração de AR obtida nessa amostra, é notável que ainda há presença de oligômeros solúveis disponíveis, já que a concentração de ART representa o dobro de AR. Desse modo, objetivando-se aumentar a concentração de carboidratos fermentescíveis, um novo planejamento experimental foi realizado, mantendo-se a temperatura constante, o qual é discutido na próxima seção.

Na sequência foi realizada a análise estatística do planejamento experimental. Para tal, foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que a probabilidade ( $p$ ) foi menor do que 0,05. Com os resultados apresentados na Tabela 8, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta empregando o *software* Statistica 7.0.

Para a variável de resposta AR, o gráfico de Pareto da Figura 15 demonstra que houve significância, para um nível de 95% de confiança, apenas para os fatores temperatura, tempo e a interação desses fatores (1\*2). Foi possível determinar os coeficientes de regressão dos fatores, bem como as interações com os parâmetros significativos e não significativos, a 5% de significância. Para a construção do modelo foram removidos os coeficientes dos fatores não significativos, utilizando-se as variáveis codificadas, conforme a Equação 11. Para a validação do modelo, foi realizado o teste-F de falta de ajuste.

Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  podem ser observados na Tabela 9. O valor de  $F_{\text{tabelado}}$  é encontrado para significância de 5% e pelos valores de graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro. Como  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , significa que não há falta de ajuste e o modelo é bem explicado. Desse modo, foi possível construir a superfície de resposta ao modelo, apresentada na Figura 16. Observa-se que os efeitos de temperatura e tempo são positivos, assim, ao se aumentar ambos os fatores os maiores valores de AR foram obtidos. Isso era esperado, pois a severidade do processo é aumentada, e as ligações glicosídicas são rompidas mais facilmente (HAFID *et al.*, 2017). Contudo, ao se elevar mais a temperatura do processo, pode ocorrer degradação dos carboidratos simples a furanos e ácidos orgânicos, além de promover reações irreversíveis entre proteína e carboidratos, as conhecidas reações de Maillard (DING *et al.*, 2017).

Figura 15 - Gráfico de Pareto para Açúcares Redutores (AR) do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).



Fonte: O autor (2022)

$$AR = 17,64 + 3,00 * x + 8,25 * y + 4,50 * x * y \quad (11)$$

em que, x é o tempo e y é a temperatura

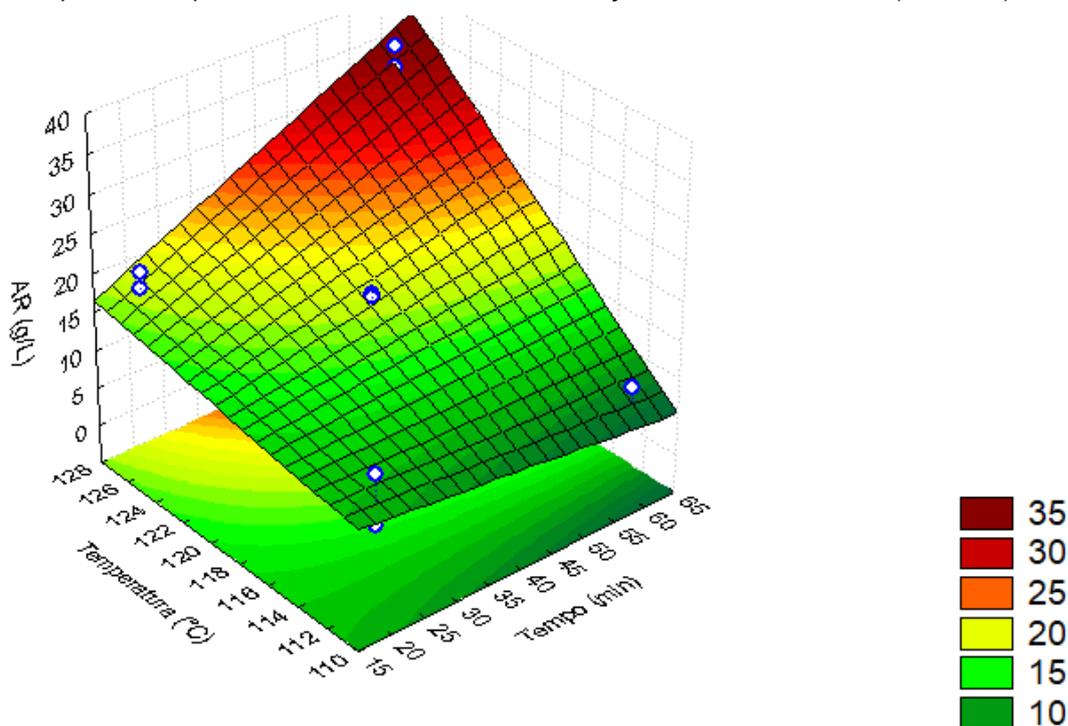
Tabela 9 – Análise de variância para variável AR do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F <sub>calculado</sub>
Tempo (1)	72,29	1	72,29	59,79
Temperatura (2)	544,85	1	544,85	450,64
1*2	162,08	1	162,08	134,06
Falta de ajuste	33,02	5	6,60	5,46
Erro puro	2,42	2	1,21	
Total	814,67	10		

F<sub>tabelado</sub> (5:2;0,05): 19,30 %variação explicada (R<sup>2</sup>): 95,65%

Fonte: O autor (2022)

Figura 16 – Superfície de resposta para variável Açúcares Redutores (AR) do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração constante de ácido (0,5% v/v).



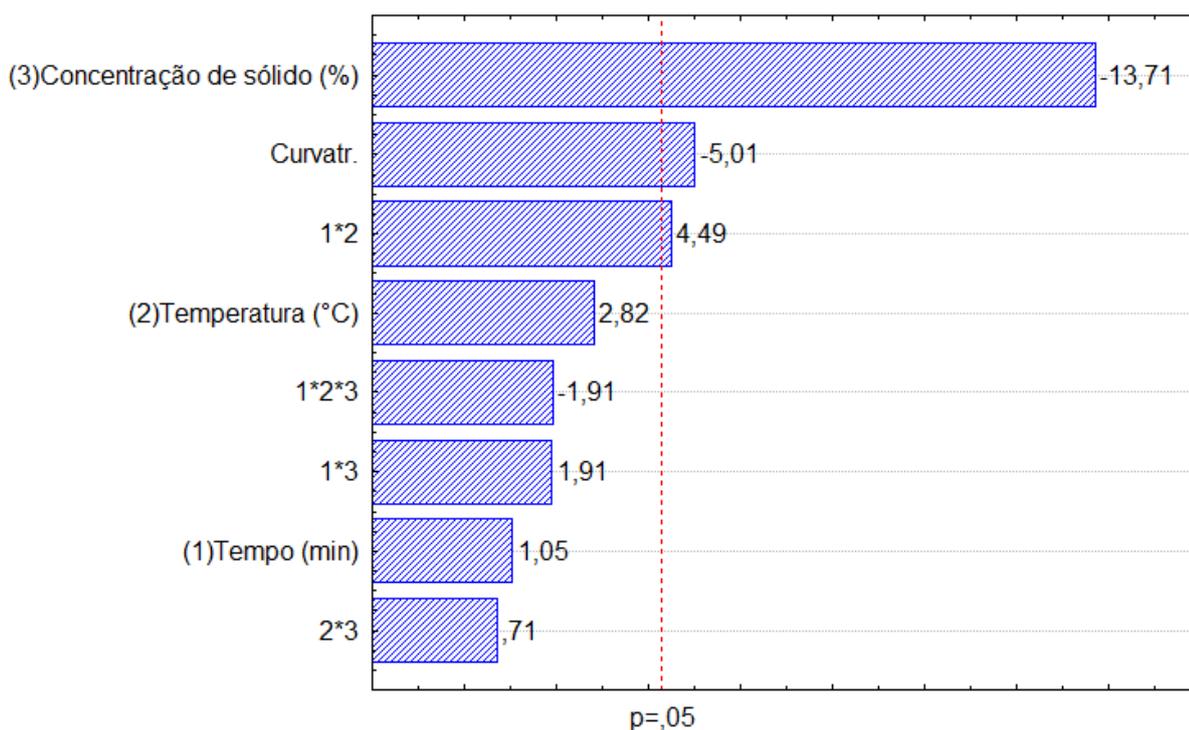
Fonte: O autor (2022)

Como observado, maiores temperaturas levam a maior formação de açúcares simples, logo, contribuindo para o processo de hidrólise, o que também foi observado com o tempo, o que é esperado pela maior severidade do processo (FOCKINK *et al.*,

2018). Contudo, é importante observar que reações indesejáveis podem ocorrer como a degradação dos carboidratos a inibidores (HMF, furfural e ácidos orgânicos), além da formação de pseudo-lignina (SHINDE *et al.*, 2018). Apesar da concentração de sólidos não ter sido significativa, espera-se uma maior concentração de AR com o aumento desse fator, já que haverá mais carboidratos disponíveis no meio. Contudo, cargas muito elevadas podem levar a dificuldades de transferência de massa e operações de reatores em escalas maiores (CHEN; LIU, 2016).

Já para a variável ART, conforme gráfico de Pareto da Figura 17, a carga de sólidos, a relação entre tempo e temperatura ( $1^*2$ ) e a curvatura foram significativas a 5% de significância. A curvatura é significativa quando a resposta média no ponto central é significativamente maior ou menor do que as respostas médias dos fatores nos ensaios mais altos e mais baixos. Para ajustar o modelo, seria necessário a adição de pontos axiais, construindo-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Contudo, a ideia desse estudo foi entender o efeito das variáveis presentes no processo, norteadando uma futura otimização. Retirando-se a curvatura e as variáveis significativas do modelo, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) se torna muito baixo, de apenas 87%. Como o modelo não representaria o processo, as análises para essa variável resposta não foram realizadas.

Figura 17 - Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores Totais (ART) do planejamento experimental para hidrólise ácida com concentração de ácido constante (0,5% v/v).



Fonte: O autor (2022)

A diferença entre ART e AR indica que há a presença de oligômeros solúveis, ou polissacarídeos, como amilopectina e amilose. Assim, poderia ser realizado uma hidrólise enzimática da fração líquida em sequência, ou aumentar a severidade do processo ácido, a fim de se obter mais açúcares redutores. Desse modo, foi realizado um novo planejamento experimental, conforme discutido na próxima seção.

### 5.3.2 Planejamento Experimental com Temperatura Constante

Como os resultados anteriores sugeriram uma maior influência da temperatura, um novo planejamento foi realizado mantendo-se essa variável constante. Apesar da autoclave (AB-19, Phoenix) utilizada operar a temperaturas mais elevadas, escolheu-se trabalhar com a temperatura de 127°C, evitando-se condições severas que poderiam ocasionar a formação de inibidores e promover reações de Maillard entre carboidratos e proteínas, as quais são irreversíveis acima de 150 °C (DING *et al.*, 2017). Os resultados do novo planejamento estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Variáveis resposta do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).

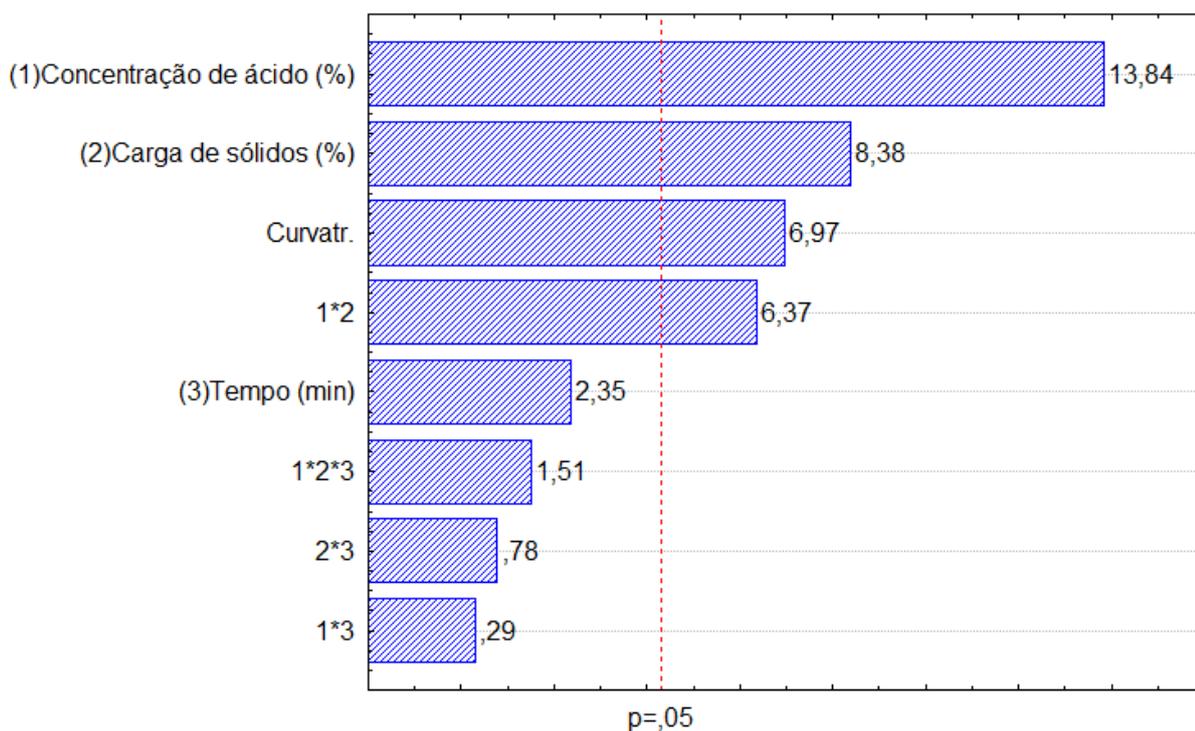
<b>Ensaio</b>	<b>Concentração de ácido (% v/v)</b>	<b>Carga de sólidos (% m/v)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>AR (g/L)</b>	<b>ART (g/L)</b>
1	0,5	5	20	5,94	16,18
2	0,5	5	60	13,46	24,89
3	0,5	15	20	13,32	42,12
4	0,5	15	60	16,88	54,43
5	1,5	5	20	29,32	26,44
6	1,5	5	60	30,28	27,97
7	1,5	15	20	62,85	84,57
8	1,5	15	60	76,14	58,73
9A	1,0	10	40	52,60	35,35
9B	1,0	10	40	49,31	40,27
9C	1,0	10	40	45,01	53,81

Fonte: O autor (2022)

O planejamento foi avaliado no *software* Statistica 7.0. Para a variável AR, o gráfico de Pareto da Figura 18 informa que houve significância apenas para a concentração de ácido, a carga de sólidos, a relação entre esses parâmetros (1\*2) e a curvatura. Conforme explicado na seção anterior, a curvatura aqui foi desprezada, já que não se planejou um DCCR. Ao se desprezar a curvatura e os coeficientes não significativos, o coeficiente de determinação do modelo reduziu de 99,4% para 83,7%. Como o modelo não seria representativo, não foi dado sequência as análises do planejamento, sendo notável a importância de se realizar um DCCR, ou análise com modelos estocásticos em trabalhos futuros.

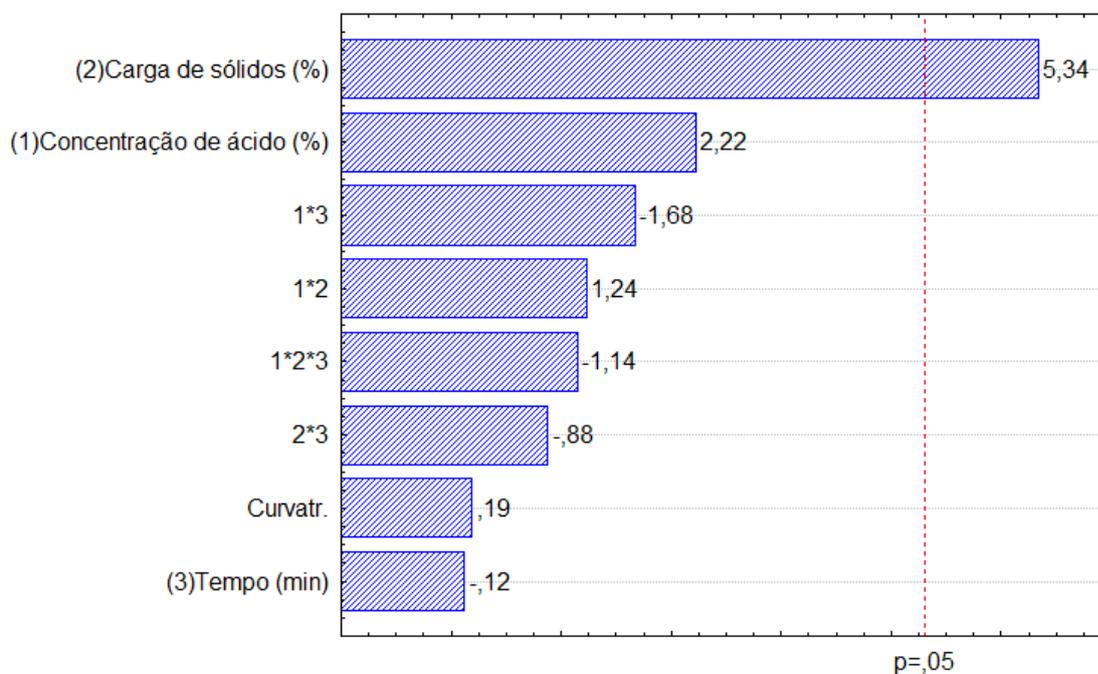
Do mesmo modo, para ART, foi construído o gráfico de Pareto da Figura 19. Apenas a concentração de sólidos foi significativa para essa variável. Ao se remover os fatores não significativos, o coeficiente de determinação do modelo foi de 68,0%, não sendo, portanto, confiável a sua construção. Assim, os resultados encontrados serviram apenas de norteamento para as etapas subsequentes, usando-se o valor de AR para a tomada de decisão.

Figura 18 – Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores (AR) do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).



Fonte: O autor (2022)

Figura 19 – Gráfico de Pareto para variável Açúcares Redutores Totais (ART) do planejamento experimental para hidrólise ácida com temperatura constante (127 °C).



Fonte: O autor (2022)

O ensaio 8 (1h, 1,5% de ácido e 15% de sólidos) apresentou os melhores resultados de AR. O experimento foi repetido em duplicata a fim de se obter dados estatísticos mais confiáveis. Obteve-se uma concentração de  $78,69 \pm 8,36$  g/L de AR e  $55,37 \pm 15,96$  de ART. O valor de ART ser menor que o de AR pode indicar falhas no método, pois por ser colorimétrico demanda diferentes etapas, levando a erros sistemáticos. Além disso, por se realizar uma hidrólise ácida em um meio já acidificado, reações de degradações de açúcares podem ser promovidas (ZABED *et al.*, 2017). Houve um aumento de 136,5% na concentração de açúcares fermentescíveis comparando o resultado com o planejamento anterior. Se descontado os 3,4 g/L de açúcar presente no controle, obtém-se um valor médio de  $75,29 \pm 7,89$  g/L, 126% superior àquele obtido na hidrólise enzimática. A hidrólise ácida do material desengordurado, sob as mesmas condições, resultou em valores sem diferença significativa a 95% de confiança, já descontado o controle:  $83,71 \pm 2,64$  g/L de AR e  $42,93 \pm 10,54$  g/L de ART. Logo, para essa etapa do processo, a remoção de lipídios não teve qualquer influência.

Para o experimento, foram utilizados 10 g de biomassa, logo, havia 6,63 g de glucano (66,26%) no material. Com volume reacional de 67 mL, a concentração de glucano era de 98,9 g/L, logo, o volume máximo de glicose seria de 109,77 g/L (1 g de glucano forma 1,11 g de glicose). Assim, com a produção de 83,71 g/L de AR, a eficiência da hidrólise ácida foi de 76,26%, superior à hidrólise enzimática.

O resultado encontrado neste estudo foi superior aos de outros autores. Kim *et al.* (2018) obtiveram um rendimento de 48,4% usando 0,37% (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 149,8 °C e 123,6 min, enquanto Hafid *et al.* (2017) obtiveram um rendimento de 42,4% ao hidrolisar resíduos de alimentos com 1,5% (v/v) de HCl, a 90 °C durante 3 h. A comparação com outros trabalhos é difícil, pois as biomassas tendem a sofrer variações com o local de coleta.

### 5.3.3 Reciclo

O reciclo de frações líquidas de pré-tratamentos de biomassa é discutido em diversos estudos (ALENCAR *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2018; VAZ *et al.*, 2021), pois possui como pontos positivos a redução de custos de insumos do processo e a redução de efluentes gerados. Pouco se discute a respeito de recircular as frações

líquidas após a hidrólise química, aumentando-se a concentração de carboidratos fermentescíveis no meio hidrolisado, além de se reduzir custos com o insumo utilizado. Contudo, a severidade do processo aumenta, o que pode gerar a degradação dos carboidratos simples a inibidores fermentativos, como HMF e furfural (ZABED *et al.*, 2017). Além disso, a alta severidade tende a formar pseudo-lignina pela polimerização de intermediários derivados de HMF e furfural, a qual atua também como inibidor (SHINDE *et al.*, 2018).

Neste estudo, as frações líquidas do material hidrolisado foram recirculadas três vezes, hidrolisando novas biomassas, não tratada e desengordurada. O pH do meio foi aferido, conforme ilustrado na Figura 20. Não houve diferença na aferição de pH nas duplicatas realizadas. Nota-se que, para o material desengordurado, o pH inicial (ponto 0) – 0,44 – foi ligeiramente inferior ao não tratado (0,74), já que foram feitos com soluções distintas. Contudo, observa-se perfil de aumento de pH semelhante. Infere-se que os íons  $H_3O^+$  estão sendo consumidos durante o processo de hidrólise, aumentando o pH do meio para 2,81 e 2,64 após o 3º ciclo para o RA não tratado e desengordurado, respectivamente. Logo, é suposto que haja uma queda na eficiência do processo.

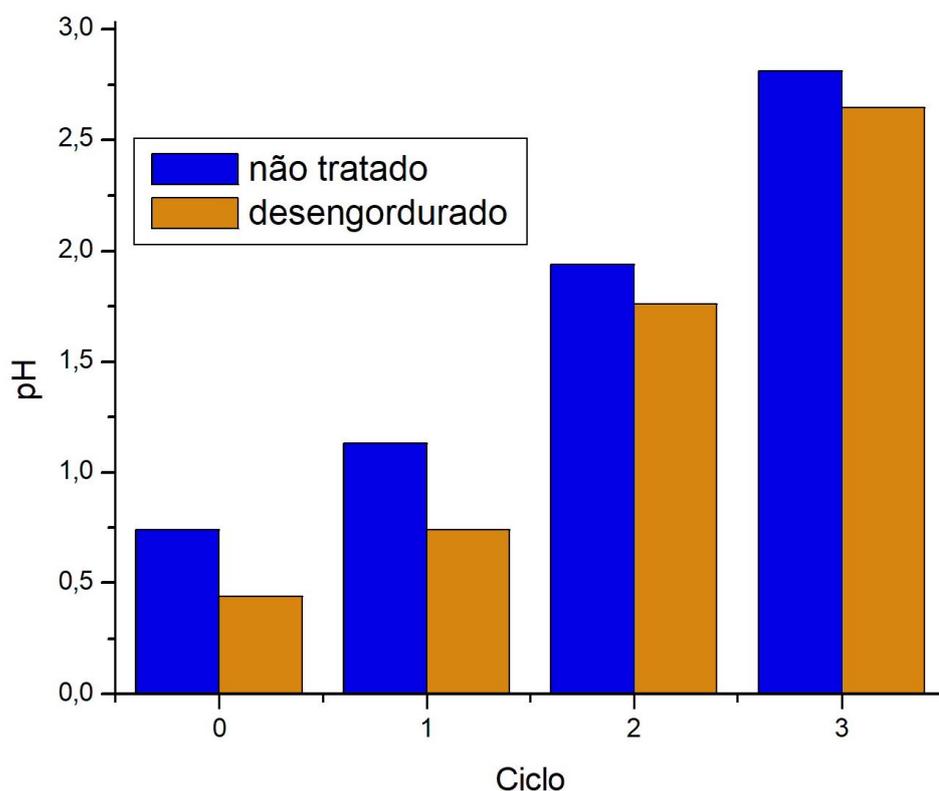
Essa inferência pode ser comprovada observando-se o rendimento mássico de cada ciclo (Figura 21). É observado que há um aumento do rendimento, ou seja, menos massa é perdida, ou degradada, nos ciclos subsequentes. No último ciclo, houve um acúmulo de massa, indicando que possivelmente materiais outrora solúveis ficaram retidos na fração sólida. Além disso, a observação qualitativa é de que o material possui uma alta umidade ligada, pois ao tentar macerá-lo para caracterização, observou-se que uma massa pegajosa foi formada. Houve diferença significativa, a 95% de confiança, entre o RA não tratado e desengordurado para os ciclos 1 e 3. Possivelmente porque os lipídios não estão sendo solubilizados, aumentam o rendimento mássico do desengordurado no ciclo 1. Já para o ciclo 3, o material desengordurado possivelmente se aglutina melhor.

Para os resultados de AR (Figura 22), não foram observadas diferenças significativas, para um nível de 95% de confiança, entre os materiais não tratado e desengordurado, porém houve diferença significativa entre os ciclos analisados. Observa-se que, para o material não tratado, houve um aumento de 27% no teor de AR entre o primeiro e segundo ciclo, atingindo uma concentração de  $100,02 \pm 1,52$

g/L, e um aumento de 53,74% no teor de AR entre o primeiro e o terceiro ciclo, com uma concentração final de  $120,98 \pm 8,87$  g/L. Já para o material desengordurado, esses aumentos foram, respectivamente, de 19,5% (AR de  $104,17 \pm 0,76$  g/L) e de 9,5% (AR de  $95,38 \pm 4,05$  g/L), havendo uma queda de 8,4% entre o segundo e o terceiro ciclo, possivelmente devido ao carboidrato ser degradado ou retido na fração sólida.

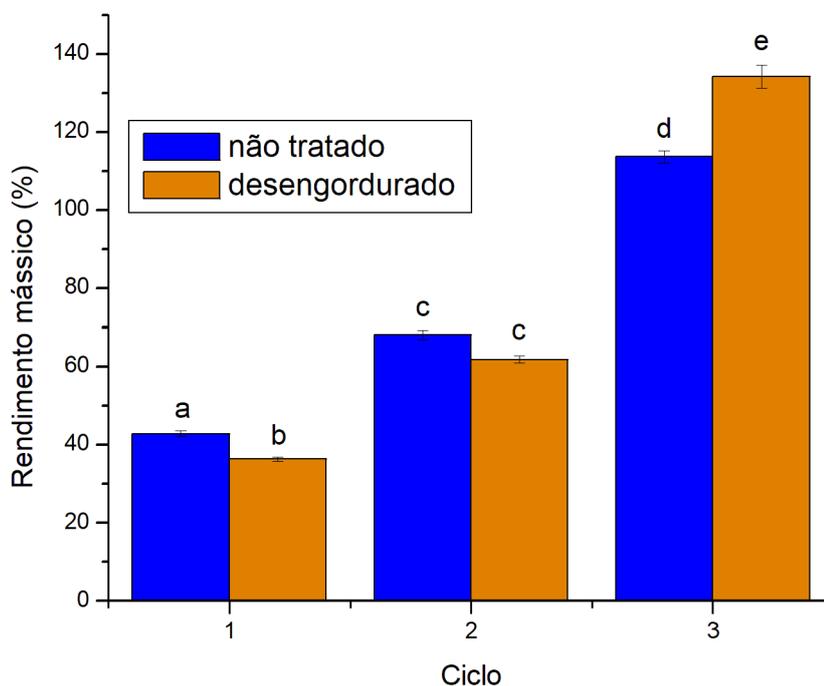
Os resultados de ART (Figura 23) tiveram perfil semelhante ao de AR, não sendo observada diferença significativa entre AR e ART, para um nível de 95% de confiança, entre os seus valores. Logo, é possível inferir que todos os carboidratos que foram solubilizados foram convertidos a glicose. Pelas condições empregadas, possivelmente, a glicose obtida é proveniente do amido, pois a celulose possui maior recalcitrância (ZABED *et al.*, 2017).

Figura 20 – Variação do pH do líquido hidrolisado para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% v/v de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min).



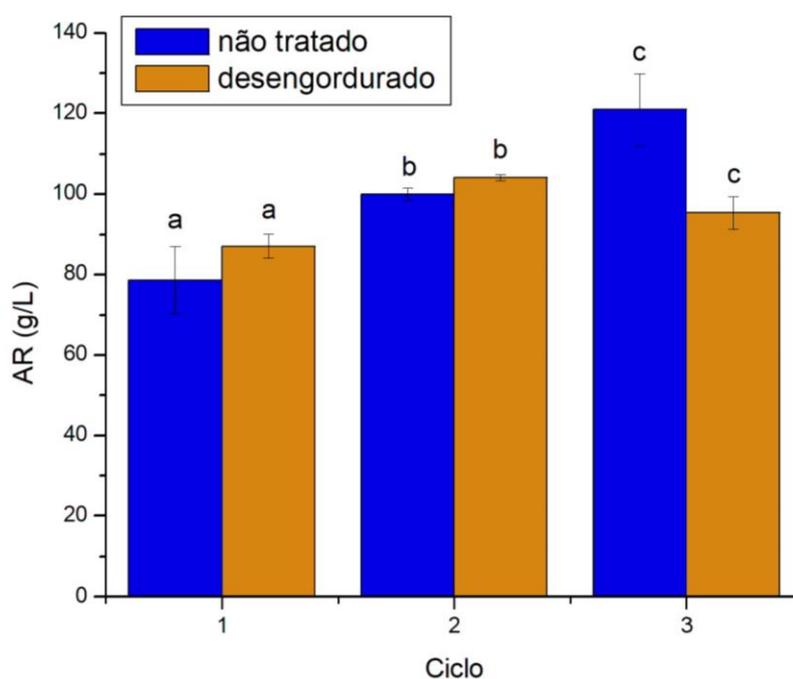
Fonte: O Autor (2022)

Figura 21 – Rendimento mássico para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança.



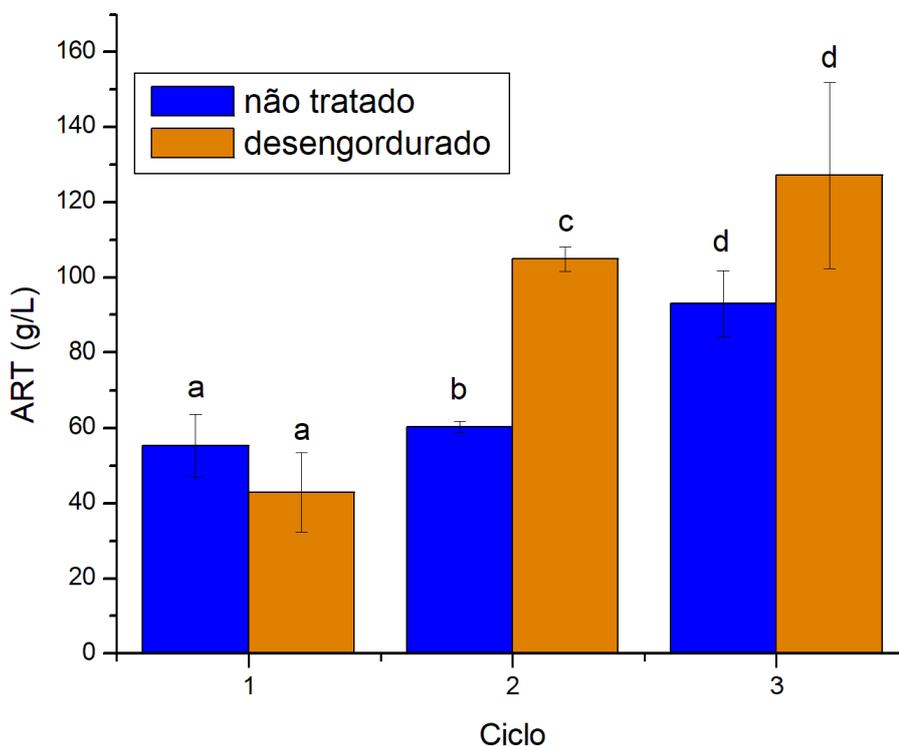
Fonte: O Autor (2022)

Figura 22 – Resultados de AR (g/L) para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança



Fonte: O Autor (2022)

Figura 23 – Resultados de ART (g/L) para experimentos de reciclo de hidrólise ácida (127 °C, 1,5% de ácido sulfúrico, 15% de sólidos e 60 min). Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança



Fonte: O Autor (2022)

A fim de melhor se observar os resultados, as biomassas residuais a cada ciclo foram caracterizadas. A Tabela 11 apresenta essas caracterizações em comparação a biomassa inicial do processo (não tratado e desengordurada). Inicialmente, observa-se que há redução nas concentrações de todos os componentes (exceto a lignina) no material desengordurado. Possivelmente, o n-hexano extrai outros compostos durante o processo de extração de lipídios. Observa-se também, pelos valores médios, o aumento da concentração de solúveis em água, o que comprova a hipótese de que há material retido na biomassa após o processo, com maiores concentrações observadas na biomassa após o terceiro ciclo.

Em relação ao glucano, observa-se que há uma redução em sua concentração em todos os ciclos. Para o RA não tratado essa redução foi de 86,8%, 88,25 e 83,62%, respectivamente para primeiro, segundo e terceiro ciclos. Já para o RA desengordurado, essa redução foi de respectivamente 72,38%, 83,18% e 77,31% para primeiro, segundo e terceiro ciclos.

A análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) revelou uma concentração de glicose de  $2,53 \pm 0,69$  g/L na fração solúvel em água do material não tratado e de  $1,45 \pm 0,62$  g/L na fração solúvel do material desengordurado. É observado um aumento dessa concentração nos primeiros ciclos ( $5,43 \pm 2,83$  g/L para não tratado e  $6,22$  g/L para o desengordurado) e uma redução nos ciclos seguintes, conforme apresentado na Tabela 11. Assim, é possível inferir que há outros componentes solúveis na biomassa, provavelmente oligossacarídeos provenientes das hidrólises de amido e celulose, os quais não foram possíveis quantificar. Nesse sentido, existe a possibilidade de se extrair esses solúveis e se propor uma nova hidrólise dos extraíveis, observando-se as concentrações de carboidratos fermentescíveis que serão produzidas.

Com relação a lignina, como os demais componentes são solubilizados, espera-se o aumento de sua concentração. Contudo, houve um aumento de 13 vezes ao se comparar o material não tratado e o primeiro ciclo. Pela severidade do processo (alta temperatura, pressão e tempo de residência), é esperado a formação de pseudo-lignina, formada pela degradação de HMF e furfural, a qual é quantificada como lignina (SHINDE *et al.*, 2018). Para os segundo e terceiro ciclos, houve uma redução da formação de pseudo-lignina, pois há uma queda na severidade (aumento do pH e redução da concentração de ácido). Em relação ao material desengordurado, há uma maior lignina inicial, pois houve extração da fração lipídica, aumentando a concentração dos demais componentes. O aumento da lignina foi inferior ao observado no material não tratado, o que pode ser um indicativo da interferência de lipídios na reação de formação de pseudo-lignina. Essa hipótese deve ser melhor estudada futuramente.

Tabela 11 – Composição química do resíduo de alimento de refeitório não tratado, desengordurado, e após ciclos de hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1,5% (v/v), 127 °C, 15% de carga de sólidos durante 1 h em autoclave de bancada. 1 IN = 1° ciclo não tratado; 2 IN = 2° ciclo não tratado; 3 IN = 3° ciclo não tratado; 1 DEN = 1° ciclo desengordurado; 2 DEN = 2° ciclo desengordurado; 3 DEN = 3° ciclo desengordurado.

Componente	Concentração (%bs <sup>a</sup> )							
	Não tratado	Desengordurado	1 IN	2 IN	3 IN	1 DEN	2 DEN	3 DEN
Solúveis em H <sub>2</sub> O	40,87 ± 0,27	33,02 ± 4,66	62,95 ± 6,44	58,11 ± 1,09	66,44 ± 2,44	63,26 ± 1,31	67,53 ± 1,29	69,50 ± 7,54
<i>Glicose (g/L)</i> <sup>b</sup>	2,53 ± 0,69	1,45 ± 0,62	5,43 ± 2,84	2,65 ± 0,37	3,14 ± 2,23	6,22 ± 0,00	2,90 ± 0,37	1,32 ± 0,71
Glucano <sup>c</sup>	66,26 ± 8,10	38,53 ± 4,98	8,73 ± 0,18	7,78 ± 1,89	10,85 ± 1,08	10,64 ± 0,80	6,48 ± 0,47	8,74 ± 2,54
Lignina insolúvel	2,77 ± 0,31	9,49 ± 0,21	35,97 ± 8,07	18,14 ± 1,66	15,48 ± 3,19	25,20 ± 5,90	21,05 ± 1,29	33,80 ± 1,66
Lipídios	11,78 ± 0,24	0,00	21,89 ± 0,85	21,86 ± 0,62	14,60 ± 0,90	0,00	0,00	0,00
Proteínas	22,85 ± 1,97	23,06 ± 4,33	19,88 ± 0,26	22,34 ± 2,08	13,75 ± 0,53	30,53 ± 0,40	14,34 ± 1,14	24,56 ± 1,08
Cinzas	8,63 ± 0,80	7,26 ± 0,15	6,28 ± 0,77	8,50 ± 3,36	7,19 ± 0,23	7,75 ± 0,05	9,50 ± 0,78	7,53 ± 0,13
Extrativos	10,74 ± 0,45	2,51 ± 0,47	44,42 ± 0,37	35,98 ± 2,27	36,49 ± 0,79	9,34 ± 0,12	8,30 ± 0,25	7,86 ± 1,27

<sup>a</sup>bs = base seca

<sup>b</sup>concentração de glicose na fração solúvel em H<sub>2</sub>O

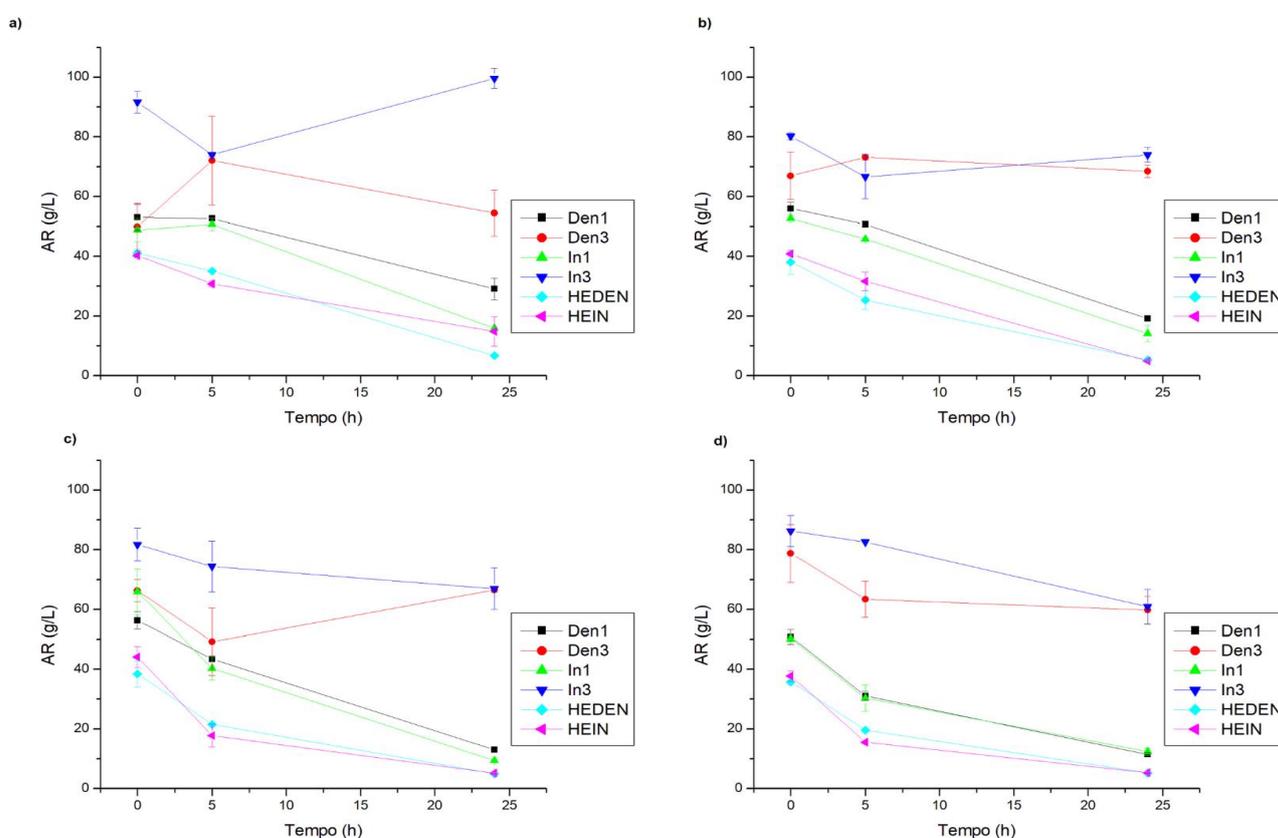
<sup>c</sup>glucano = celulose e amido

Fonte: O autor (2022)

## 5.4 FERMENTAÇÃO

Foram fermentados os hidrolisados ácidos do primeiro e do terceiro ciclos, bem como os hidrolisados enzimáticos, do RA não tratado e desengordurado. Foram utilizadas quatro cepas diferentes, sendo duas de *Saccharomyces cerevisiae* (P6 H9 – levedura adaptada – e JP1 – levedura industrial), uma de *Dekkera bruxelensis* (DB) e uma de *Meyerozyma caribbica* (MC). Na Figura 24, pode-se observar o consumo de AR (g/L) para os diferentes meios e diferentes leveduras.

Figura 24 – Concentração de Açúcares Redutores (AR), em g/L, para fermentação estática à temperatura ambiente (25 – 30 °C) com diferentes leveduras ao longo do tempo. a) JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial, b) P6H9 = *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para tolerar maiores teores de HMF, c) DB = *Dekkera bruxellensis*, d) MC = *Meyerozyma caribbica*. DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado.



Fonte: O Autor (2022)

Observa-se que, para todos os microrganismos estudados, houve um maior consumo de AR para o hidrolisado enzimático, pois estes possuíam uma concentração inicial menor, logo com menor efeito de inibição por substrato nas leveduras. É notável que, apesar da alta concentração de açúcares, dos meios do 3º ciclo (linhas preta e vermelha), não houve consumo de açúcares em JP1 e em P6H9. Houve um baixo consumo de AR ao utilizar as leveduras DB e MC, indicando que essas cepas, possuem maior tolerância a meios estressantes.

Schifferdecker *et al.* (2014) observaram que linhagens de *D. bruxellensis* expressam o gene *MSN4* responsável pelo estresse osmótico, em concentrações maiores de etanol do que *S. cerevisiae*. Linhagens de *M. caribbica* também se mostraram mais tolerantes a meios salinos (> 100 mM de NaCl, KCl e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (JAN *et al.*, 2019). Além disso, uma maior tolerância dessas leveduras a meios hidrolisados com inibidores foi identificada. Por exemplo, *D. bruxellensis* obteve uma boa adaptação a meios com 1,5 g/L de furfural e 1,65 g/L de HMF (BLOMQVIST *et al.*, 2011), enquanto *M. caribbica*, adaptou-se a meios com 3 g/L de furfural e 1 g/L de HMF (SOARES; BERGMANN; ALMEIDA, 2021).

Na Figura 25 são apresentadas as porcentagens de açúcar consumido por cada levedura em cada meio. Nota-se que, para os meios enzimáticos, as cepas P6H9, DB e MC, consumiram mais de 85% do AR disponível, enquanto JP1, linhagem industrial, atingiu  $84 \pm 2\%$  para o meio desengordurado, e apenas  $63 \pm 13\%$  para o meio não tratado. Para os meios ácidos, *Dekkera* e *Meyerozyma* se mostraram mais efetivas, atingindo um consumo de  $86 \pm 1\%$  para *Dekkera* em meio do RA não tratado. Em relação à levedura *S. cerevisiae*, tanto a linhagem industrial quanto a modificada geneticamente, apresentou pouca eficiência nesse meio. No meio hidrolisado de 3º ciclo ácido, JP1 não apresentou consumo de açúcar, P6H9, DB e MC apresentaram baixo consumo de AR no meio não tratado, enquanto no meio desengordurado, apenas MC consumiu açúcar. Contudo, os valores ainda foram muito baixos (máximo de  $29 \pm 2\%$ ), indicando que esse meio, apesar de possuir altas concentrações de açúcares, provavelmente necessitaria de um tratamento antes da fermentação, a fim de se retirar potenciais inibidores (desintoxicação).

Em relação a produção de bioetanol, observa-se um perfil semelhante ao de consumo de carboidratos, conforme Tabela 12. As maiores concentrações de etanol (aproximadamente 30 g/L) foram obtidas para as frações líquidas dos meios enzimáticos (não tratado e desengordurado) e dos meios hidrolisados ácidos de 1º

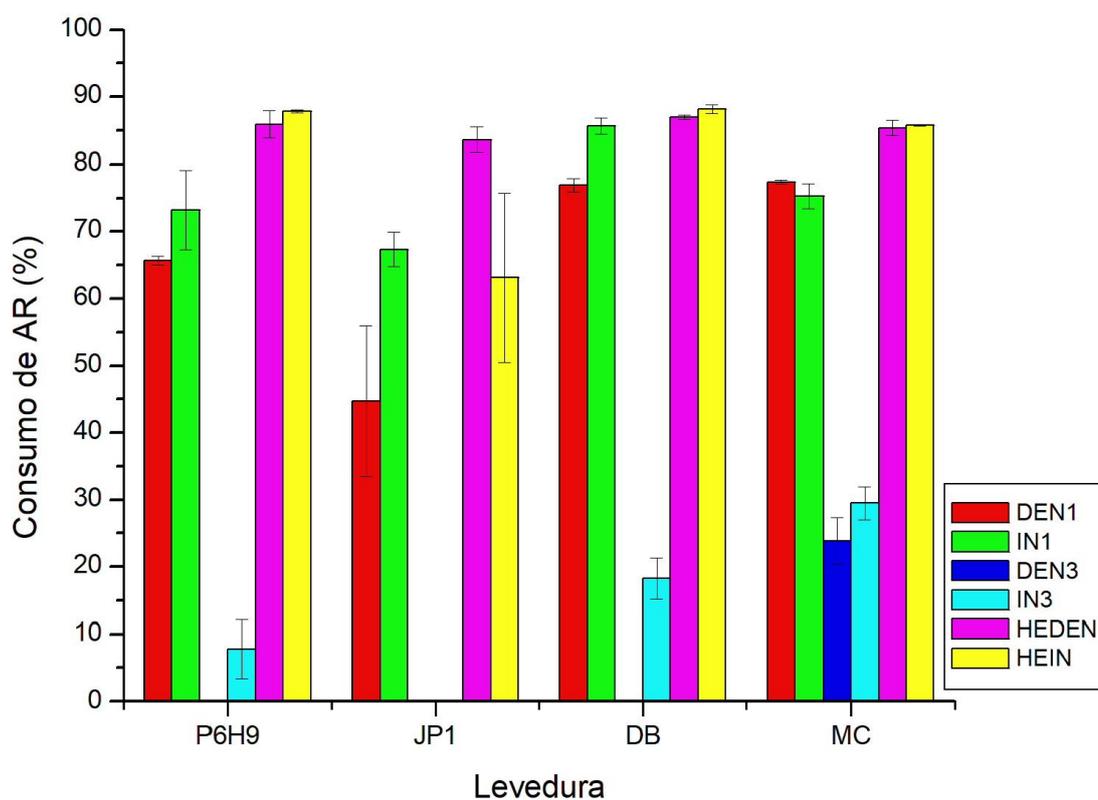
ciclo não tratado, para as cepas P6H9, DB e MC. Apesar de consumos de AR semelhantes dos hidrolisados ácidos de 1º ciclo não tratado e desengordurado, houve uma baixa produção de bioetanol nos meios desengordurados. Para *Meyerozyma caribbica*, por exemplo, houve uma produção de apenas  $7,37 \pm 0,29$  g/L de bioetanol para o desengordurado; enquanto para o meio não tratado esse valor foi de  $32,32 \pm 0,56$  g/L, 338% superior.

Essa diferença, contudo, não foi observada para os hidrolisados enzimáticos. Comparando-se para a cepa de *Meyerozyma*, foi produzido  $29,92 \pm 0,48$  g/L de bioetanol no hidrolisado enzimático desengordurado e, no não tratado,  $27,98 \pm 0,26$  g/L. A ordem de grandeza e diferenças é semelhante para as demais cepas estudadas. Possivelmente, existe a formação de algum composto durante a hidrólise ácida, pois essa não é específica como a enzimática, que seja inibitório a fermentação. Isso está associado a multiplicidade de componentes do RA.

Em relação aos hidrolisados de 3º ciclo, a cepa JP1 não produziu bioetanol. As demais cepas tiveram uma baixa produção, com um máximo de  $13,33 \pm 0,54$  g/L para *Dekkera* do meio não tratado. Logo, o resultado condiz ao esperado pelo consumo de AR analisado anteriormente.

Estudos anteriores com resíduo de alimentos, identificaram uma produção de bioetanol de 29,1 g/L (MOON *et al.*, 2009) e 40 g/L (SUN *et al.*, 2020), ao se realizar hidrólises enzimáticas e fermentação com *S. cerevisiae* industrial. Em relação a hidrolisados ácidos, houve uma produção de 25 g/L após fermentação com *I. orientalis* (KIM *et al.*, 2018). Hafid *et al.* (2017) após uma sequência de hidrólises ácida e enzimática e fermentação com *S. cerevisiae* por 24 h obtiveram 10,92 g/L de bioetanol. Assim, observa-se que a rota aqui proposta tem produção superior ou próxima das rotas anteriormente discutidas. Além disso, existe um potencial de se obter maiores concentrações de bioetanol a partir do reciclo de ácido sulfúrico, reduzindo custos com esse insumo.

Figura 25 – Consumo de Açúcares Redutores (AR), em %, após 24 h de fermentação de meios hidrolisados ácidos e enzimáticos, com diferentes leveduras, a 10% de sólidos, estática e à temperatura ambiente (25 – 30 °C). JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial; P6H9 = *Saccharomyces cerevisiae* adaptada para tolerar maiores teores de HMF; DB = *Dekkera bruxellensis*; MC = *Meyerozyma caribbica*; DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado.



Fonte: O Autor (2022)

Tabela 12 – Produção de bioetanol, em g/L, após 24 h de fermentação de meios hidrolisados ácidos e enzimáticos, com diferentes leveduras, a 10% de sólidos, estática e à temperatura ambiente (25 – 30 ° C). JP1 = *Saccharomyces cerevisiae* industrial; P6H9 = *Saccharomyces cerevisiae* adaptada para tolerar maiores teores de HMF; DB = *Dekkera bruxellensis*; MC = *Meyerozyma caribbica*; DEN1 = 1° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN1 = 1° ciclo hidrólise ácida não tratado; DEN3 = 3° ciclo hidrólise ácida desengordurado; IN3 = 3° ciclo hidrólise ácida não tratado; HEDEN = hidrolisado enzimático desengordurado; HEIN = hidrolisado enzimático não tratado. Letras iguais representam dados sem diferença estatística a 95% de confiança

Levedura	Meio	Produção de etanol (g/L)
JP1	DEN1	4,48
	IN1 <sup>a</sup>	24,15 ± 0,56
	DEN3	0,00
	IN3	0,00
	HEDEN <sup>a</sup>	20,53 ± 1,75
	HEIN <sup>a</sup>	21,94 ± 0,50
P6H9	DEN1	18,54
	IN1 <sup>b</sup>	30,98 ± 1,68
	DEN3	4,61
	IN3	8,23 ± 2,50
	HEDEN <sup>b</sup>	33,46 ± 3,82
	HEIN <sup>b</sup>	29,15 ± 2,43
DB	DEN1 <sup>b,c</sup>	26,13
	IN1 <sup>b,d</sup>	30,79 ± 0,33
	DEN3	11,49 ± 4,88
	IN3	13,33 ± 0,54
	HEDEN <sup>a,b,c,d</sup>	27,60 ± 2,14
	HEIN <sup>b,c</sup>	26,55 ± 0,47
MC	DEN1	7,37 ± 0,29
	IN1 <sup>b,d</sup>	32,32 ± 0,56
	DEN3	10,93 ± 1,78
	IN3	9,01 ± 1,45
	HEDEN <sup>b,d</sup>	29,92 ± 0,48
	HEIN <sup>b</sup>	27,98 ± 0,26

Fonte: O autor, 2022

Observando-se a produção mundial de resíduo de alimentos de 1,3 bilhões de toneladas (GUSTAVSSON *et al.*, 2011). Para uma biomassa com 85% de umidade, o total de resíduo seco é de  $19,5 \times 10^{10}$  kg. Usando o valor deste estudo de 66,26% de glucano, é possível obter  $12,87 \times 10^{10}$  kg de glucano anualmente de RA. Como a relação entre glucano e glicose é de 1,11 e a eficiência máxima conseguida no processo discutido neste estudo foi de 76,26% para a hidrólise ácida, seria possível obter  $10,86 \times 10^{10}$  kg anuais de glicose. Assim, para uma eficiência de 90% de

fermentação, seria possível produzir, anualmente,  $5,00 \times 10^{10}$  kg de bioetanol, ou seja,  $6,33 \times 10^{10}$  litros de bioetanol a partir de RA por ano. Um total de 0,32 L/kg de massa seca.

Para o estado de Pernambuco, com uma coleta de 2,37 milhões de tonelada de Resíduo Sólido Urbano por ano (SNIS, 2020), supondo-se uma média de 40% de RA nesse resíduo (948 mil toneladas anuais), seria possível obter, nas mesmas condições citadas, 46 milhões de litros de bioetanol por ano de RA, valor que representa 13 % dos 358 milhões de litros produzidos no estado na safra 2020/2021 (UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2022). Contudo, o processo descrito neste estudo deve ser aprofundado, escalonado e ter sua análise tecno-econômica-ambiental discutida.

## 6 CONCLUSÕES

Com o estudo realizado foi possível identificar o potencial de resíduos de alimentos para a bioconversão em bioetanol. Estudou-se a hidrólise ácida, apesar de menos empregada na literatura, observando-se, através de planejamentos experimentais, que os principais fatores que influenciam o processo para a obtenção de açúcares redutores são a concentração de ácido, concentração de sólidos e temperatura. Concluiu-se, pelos dados analisados, que maiores temperaturas (127 °C), maiores concentrações de sólidos (15% m/v) e maiores concentrações de ácido sulfúrico (1,5% v/v) apresentam melhores rendimentos para a hidrólise.

Comparando-se com a hidrólise enzimática, conclui-se que, para as condições empregadas neste estudo, a eficiência do processo ácido é maior. É notável também que para ambos os processos, desengordurar o material não afeta a eficiência, contrariando a literatura. Concluiu-se que, a relação entre carboidratos e lipídios da biomassa estudada provavelmente supera os processos inibitórios de gorduras e óleos.

Também foi observada a possibilidade de se recircular o ácido utilizado na hidrólise, com potencial para redução de custos com esse insumo. Apesar do aumento da concentração de carboidratos no meio, a fermentabilidade foi prejudicada, provavelmente pela alta concentração de inibidores. Processos de detoxificação poderiam ser empregados para melhorar a eficiência.

Por fim, conclui-se que a maior concentração de bioetanol (aproximadamente 30 g/L), é obtida através da fermentação dos meios hidrolisados enzimáticos e meios ácidos de 1º ciclo, com exceção da *S. cerevisiae* industrial. As leveduras *Meyerozyma caribbica* e *Dekkera bruxellensis* têm potencial de fermentar meios mais adversos, como o 3º ciclo de hidrólise ácida, pois produziram uma concentração de bioetanol na ordem de 10 g/L. Logo, devem ser melhor investigadas.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar uma caracterização mais específica para resíduos de alimentos, identificando os tipos de carboidratos e outros componentes;
- Realizar DCCR para a otimização da hidrólise ácida;
- Identificar os compostos inibidores à fermentação, bem como realizar processos de desintoxicação;
- Estudo de outras condições de fermentação;
- Integrar o processo de produção de bioetanol com a biodigestão anaeróbica dos resíduos gerados.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, B.; MUHAMMAD, S. A. F. S.; SHOKRAVI, Z.; ISMAIL, S.; KASSIM, K. A.; MAHMOOD, A. N.; AZIZ, M. M. A. Fourth Generation Biofuel: A Review on Risks and Mitigation Strategies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 107, 2019.
- ABRELPE – Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil | 2020**, 2021.
- AI, Y.; HASJIM, J.; JANE, J. Effects of Lipids on Ezymatic Hydrolysis and Physical Properties of Starch. **Carbohydrate Polymers**. v, 92, 2013.
- ALAMANOU, D. G.; MALAMIS, D.; MAMMA, D.; KEKO, D. Bioethanol from Dried Household Food Waste Applying Non-isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation at High Substrate Concentration. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 3, p. 353–361, 2015.
- ALCÂNTARA, P. B. **Avaliação da influência da composição de resíduos sólidos urbanos no comportamento de aterros simulados**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- ALENCAR, B. R. A.; REIS, A. L. S.; DE SOUZA, R. F. R.; JR MORAIS, M. A.; MENEZES, R. S. C.; DUTRA, E. D. Recycling the Liquid Fraction of Alkaline Hydrogen Peroxide in the Pretreatment of Corn Stover. **Bioresource Technology**. v, 241, p. 928 – 935, 2017.
- BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Native Starch Granule Structure. **Biomacromolecules**. v. 11, 2010.
- BLOMQUIST, J.; SOUTH, E.; TIUKOVA, L.; MOMENI, M. H.; HANSSON, H.; Ståhlberg, J.; HORN, S. J.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysate by the Alternative Industrial Ethanol Yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 53, 2011.
- BRASIL, Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento – SNIS Resíduos Sólidos. **Ministério do Desenvolvimento Regional**. Brasília, 2020.
- BRASIL. Lei 12305 de 2 de Agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2010.
- CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. Review of Physicochemical Properties and Analytical Characterization of Lignocellulosic Biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 309-322, 2017
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos Usando o Statistica**. ed. 1, Rio de Janeiro: E-papers, 2003.

- CARMONA-CABELLO, M.; GARCÍA, I. L.; SÁEZ-BASTANTE, J.; PINIZ, S.; KOUTINAS, A. A.; DORADO, M. P. Food Waste from Restaurant Sector – Characterization for Biorefinery Approach. **Bioresource Technology**. v. 301, 2020.
- CAVALLINI, C. M.; FRANCO, C. M. L. Effect of Acid-ethanol Treatment Followed by Ball Milling on Structural and Physicochemical Characteristics of Cassava Starch. **Starch Journal**. v. 62, 2010.
- CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8–20, 2011.
- CHENG, B.; ZHANG, X.; LIN, Q.; XIN, F.; SUN, R.; WANG, X.; REN, J. A New Approach to Recycle Oxalic Acid During Lignocellulose Pretreatment for Xylose Production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, 2018.
- CHEN, H.; LIU, Z. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass from Low to High Solids Loading. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 5, p. 489-499, 2016.
- CODATO, C. B.; MARTINI, C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; BASTOS, R. G. Ethanol Production from *Dekkera bruxellensis* in Synthetic Media with Pentose. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 35, 2018.
- DA CÂMARA, F. M.; GOMES, C. B.; MATUK, T. T.; SZARFARC, S. C. Caracterização dos resíduos gerados na Ceasa paulistana sob a ótica da saúde ambiental e segurança alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 21, n. 1, p. 395, 2015.
- DA SILVA-FILHO, E. A.; DOS SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; DE MORAIS, J. O. F.; DE MORAIS JR., M. A.; SIMÕES, D., A. Yeast Population Dynamics of Industrial Fuel-ethanol Fermentation Process Assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13 -23, 2005.
- DING, L.; CHENG, J.; QIAO, D.; YUE, L.; LI, Y.; ZHOU, J.; CEN, K. Investigating hydrothermal pretreatment of Food Waste for Two-stage Fermentative Hydrogen and Methane co-Production. **Bioresource Technology**. v. 241, 2017.
- DOU, Z.; TOTH, J. D. Global Primary Data on Consumer Food Waste: Rate and Characteristics – A Review. **Resources, Conservation & Recycling**, v. 168, 2021.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food and Agriculture: Moving Forward on Food Loss and Waste Reduction**. Roma: 2019.
- FERNANDES, C. C.; MAZZOLA, B. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, M. DE M. Resíduos Alimentares e as Mudanças Climáticas. **Organizações e Sustentabilidade**, v. 53, n. 9, p. 1–30, 2016.

FLANAGAN, A.; PRIYADARSHINI, A. A Study of Consumer Behaviour Towards Food-Waste in Ireland: Attitudes, Quantities and Global Warming Potentials. **Journal of Environmental Management**. V. 284, 2021.

FOCKINK, D. H.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of Sugarcane Bagasse Steam Explosion Using Autocatalysis and Dilute Acid Hydrolysis ( $H_3PO_4$  and  $H_2SO_4$ ) at Equivalent Combined Severity Factors. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 563-572, 2018.

GIROTTO, F.; ALIBARDI, L.; COSSU, R. Food waste generation and industrial uses: A review. **Waste Management**, v. 45, p. 32–41, 2015.

GOMES, L. P.; KOHL, C. A.; SOUZA, C. L. L.; REMPEL, N.; MIRANDA, L. A. S.; MORAES, C. A. M. Avaliação ambiental de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos precedidos ou não por unidades de compostagem. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 449–462, set. 2015.

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

GUNDUPALLI, M. P.; CHUETOR, S.; CHEENKACHORN, K.; RATTANAPOM, K.; SHOW, P.; CHENG, Y.; SRIARIYANUM, M. Interferences of Waxes on Enzymatic Saccharification and Ethanol Production from Lignocellulose Biomassa. **Bioengineering**. v. 171, 2021.

GUSTAVSSON, J., CEDERBERG, C., SONESSON, U., VAN OTTERDIJK, R., MEYBECK, A.. Global food losses and food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Swedish Inst. Food Biotechnol**. 2011.

HAFID, H. S.; RAHMAN, N. A.; MOKHTAR, M. N; TALIB, A. T.; BAHARUDDIN, A. S.; SHAH, U. K. Over production of fermentable sugar for bioethanol production from carbohydrate-rich Malaysian food waste via sequential acid-enzymatic hydrolysis pretreatment. **Waste Management**, v. 67, p. 95–105, 2017.

HAN, S. K.; SHIN, H. S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 6, p. 569–577, 2004.

HUANG, H.; QURESHI, N.; CHEN, M.; LIU, W.; SINGH, V. Ethanol production from food waste at high solids content with vacuum recovery technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 2760–2766, 2015.

HAO, N.; PEDRONI, P.; COLSON, G.; WETZSTEIN, M. The Linkage Between the U.S. Ethanol Market and Developing Countries' Maize Prices: a Panel SVAR Analysis. **Agricultural Economics**, v. 48, n.º. 5, 2017.

HARARI, Y. N. Homo Deus – Uma Breve História do Amanhã. **Companhia das Letras**, ed. 1ª, p. 448, 2016.

- HSIEH, C. C.; CANNELLA, D.; JØRGENSEN, H.; FELBY, C.; THYGESSEN, L. G. Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n<sup>o</sup>. 17, p. 3800-3805, 2014.
- IPCC – Intergovernmental Painel on Climate Change. **2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. v. 5, c. 2, 2019.
- IRENA – International Renewable Energy Agency. **Power System Flexibility for the Energy Transition, Part 1: Overview for policy makers**. International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi, 2018.
- ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco. Plano Estadual de Resíduos Sólidos. **Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Sustentabilidade**, 2012.
- JAN, F. G.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, A.; IGBAL, A.; JAN, G.; KHAN, S. A.; KHAN, H.; LEE, I. A Promising Growth Promoting *Meyerozyma caribbica* from *Solanum xanthocarpum* Alleviated Stress in Maize Plants. **Bioscience Reports**. v. 39, 2019.
- KARMEE, S. K. Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 53, p. 945–953, 2016.
- KAZA, S.; YAO, L.; BHADA-TATA, P.; WOERDEN, F. V. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. **International Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank**. Washington, DC, 2018.
- KIM, J. H.; LEE, J. C.; PAK, D. Feasibility of producing ethanol from food waste. **Waste Management**, v. 31, n. 9–10, p. 2121–2125, 2011.
- KIM, Y. S.; JANG, J. Y.; PARK, S. J.; UM, B. H. Dilute Sulfuric Acid Fractionation of Korean Food Waste for Ethanol and Lactic Acid Production by Yeast. **Waste Management**. v. 74, 2018.
- KIRAN, E. U; LIU. Y. Bioethanol Production from Mixed Food Waste by an Effective Enzymatic Pretreatment. **Fuel**, v. 159, p. 463 – 469, 2015.
- MA, Y.; CAI, W.; LIU, Y. An integrated engineering system for maximizing bioenergy production from food waste. **Applied Energy**, v. 206, n. August, p. 83–89, 2017.
- MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Comunicado Técnico 85 - Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**, 2013.
- MATSAKAS, L.; KEKOS, D.; LOIZIDOU, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Utilization of household food waste for the production of ethanol at high dry material content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.
- MEDEIROS, I. N. P.; ROSADO, A. K. H. B.; DA SILVA, R. M; DA SILVA, M. R. F.; DEMASTELAERE, A. C. F. Problemas Socioambientais e dos Resíduos Sólidos no Entorno do Lixão do Município de Apodi (RN). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n<sup>o</sup>. 11, 2020.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOON, H. C.; SONG, I. S.; KIM, J. C.; SHIRAI, Y.; LEE, D. H.; KIM, J. K.; CHUNG, S. O.; KIM, D. H.; OH, K. K.; CHO, Y. S. Enzymatic Hydrolysis of Food Waste and Ethanol Fermentation. **International Journal of Energy Research**, v. 33, p. 164 – 172, 2009.

NAROZNOVA, I.; MØLLER, J.; SCHEUTZ, C. Characterisation of the Biochemical Methane Potential (BMP) of Individual Material Fractions in Danish Source-separated Organic Household Waste. **Waste Manag.**, v. 50, p. 39-48, 2016.

NIELSEN, S. S. Food Analysis Laboratory Manual, Second ed. **Springer**, New York. 2003.

OJHA, S.; BUßLER, S.; SCHLÜTER, O. K. Food Waste Valorisation and Circular Economy Concepts in Insect Production and Processing. **Waste Management**. n° 118, p. 600 – 609, 2020.

PAZUR, J.; ANDO, T. The Action of an Amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on Starch and Malto-oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 34, n° 8, 1959.

PHAM, T. P. T.; KAUSHIK, R.; PARSHETTI, G. K.; MAHMOOD, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Food Waste-to-Energy Conversion Technologies: Current Status and Future Directions. **Waste Management**. v. 38, 2015.

PIÑAS, J. A. V.; VENTURINI, O. J.; LORA, E. E. S.; DE OLIVEIRA, M. A.; ROALCABA, O. D. C. Aterros sanitários para geração de energia elétrica a partir da produção de biogás no Brasil: comparação dos modelos LandGEM (EPA) e Biogás (Cetesb). **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 33, n. 1, p. 175–188, 10 maio 2016.

PORPINO, G.; LOURENÇO, C. E.; ARAÚJO, C.M.; BASTOS, A. Intercâmbio Brasil – União Europeia sobre desperdício de alimentos. Relatório final de pesquisa. Brasília: **Diálogos Setoriais União Europeia – Brasil**, 2018. Disponível em: <  
<http://www.sectordialogues.org/publicacao>>

PRIMO-MARTÍN, C.; NIEUWENHUIJZEN, N. H.; HAMER, R. J.; VLIET, T. Crystallinity Changes in Wheat Starch During the Bread-Making Process: Starch Crystallinity in the Bread Crust. **Journal of Cereal Science**. v. 45, 2007.

PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. Amylose-inclusion Complexes: Formation, Identity and Physico-chemical Properties. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 238-247, 2010.

REIS, A. L. S.; DAMILANO, E. D.; MENEZES, R. S. C.; MORAIS JR., M. A. Second-generation Ethanol from Sugarcane and Sweet Sorghum Bagasses Using the Yeast *Dekkera Bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**. v. 92, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. ed. 3, Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1573–1586, 2011.

ROSSETO, R. E.; MADALENA, L. C. S.; DE OLIVEIRA, A. F.; CHANG, P.; PRIMIERI, B. F.; FRIGO, E. P.; SANTOS, R. F. Panorama do etanol brasileiro. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 5, p. 13–22, 2017.

SAEED, M. A; MA, H.; YUE, S.; WANG, Q.; TU, M. Concise review on ethanol production from food waste: development and sustainability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 29, p. 28851–28863, 2018.

SAEED, Z.; PALAMAE, S.; INTHARAPAT, P.; KHUNDAMRI, N.; TANRATTANAKUL, V.; TIRAWANICHAKUL, Y.; SUTTINUN, O. Enhanced Ethanol Production from Lignocellulosic Hydrolysate Using *Meyerozyma caribbica* Biofilm Immobilized on Modified Epoxy Foam. **Biomass and Bioenergy**. v. 154, 2021.

SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUCK, O. P.; PIŠKUR, J. The Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**. v. 31, 2014.

SHARMA, P.; GAUR, V. K.; SIROHI, R.; VARJANI, S.; KIM, S. H.; WONG, J. W. C. Sustainable Processing of Food Waste for Production of Bio-based Products for Circular Bioeconomy. **Bioresource Technology**. v. 325, 2021.

SHINDE, S. D.; MENG, X.; KUMAR, R.; RAGAUSKAS, A. J. Recent Advances in Understanding the Pseudo-lignin Formation in a Lignocellulosic Biorefinery. **Green Chem.**, v. 20, p. 2192-2205, 2018.

SOARES, C. E. V. F.; BERGMANN, J. C.; ALMEIDA, J. R. M. Variable and Dose-dependent Response of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts Toward Lignocellulosic Hydrolysate Inhibitors. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 52, 2021.

SOUZA, C. J. A. **Produção de Etanol por sacarificação e Fermentação Simultâneas do Bagaço de Cana-de-Açúcar utilizando Leveduras Termotolerantes**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

SUKPIPAT, W.; KOMEDA, H.; PRASERTSAN, P.; ASANO, Y. Purification and Characterization of Xylitol Dehydrogenase With l-arabitol Dehydrogenase Activity from the Newly Isolated Pentose-fermenting Yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 123, 2017.

SUN, J.; KOSAKI, Y.; WATANABE, N. Higher load operation by adoption of ethanol fermentation pretreatment on methane fermentation of food waste. **Bioresource Technology**, v. 297, n. September 2019, p. 122475, 2020.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n.1, 2002.

TAHERI, M. E.; SALIMI, E.; SARAGAS, K.; NOVAKOVIC, J.; BARAMPOUTI, E. M.; MAI, S.; MALAMIS, D.; MOUSTAKAS, K.; LOIZIDOU, M. Effect of Pretreatment Techniques on Enzymatic Hydrolysis of Food Waste. **Biomass Conversion and Biorefinery**. v. 11, 2021.

TCHOBANOGLIOUS, G.; KREITH, F. **Handbook of Solid Waste Management**. McGRAM-HILL, 2nd. ed, 2002.

THOMAS, R. L.; SHEARD, R. W.; MOYER, J. R. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion. **Agron. J.** v. 59, 1967.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Consumo de Biocombustíveis. **Observatório da cana**. Disponível em: <[https://observatoriodacana.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=2492&produto=etanol\\_total&safralni=2020%2F2021&safraFim=2020%2F2021&estado=PE](https://observatoriodacana.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=2492&produto=etanol_total&safralni=2020%2F2021&safraFim=2020%2F2021&estado=PE)>. Acesso em: 31/03/2022

VAZ, F. L.; LINS, J. R.; ALENCAR, B. R. A.; DE ABREU, I., B., S.; VIDAL, E. E.; RIBEIRO, E.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MENEZES R. S. C.; DUTRA, E. D. Chemical Pretreatment of Sugarcane Bagasse with Liquid Fraction Recycling. **Renewable Energy**, v. 174, p. 666 – 673, 2021.

VISAKH, P. M.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; THOMAS, S. Starch-based Bionanocomposites: Processing and Properties. **Polysaccharidie Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials**. 1ª ed, capítulo 11, 2012.

WIJAYA, Y. P.; PUTRA, R. D. D.; WIDYAYA, V. T.; HÁ, J.; SUH, D. J.; KIM, C. S. Comparative Study on Two-step Concentrated Acid Hydrolysis for the Extraction of Sugars from Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 164, 2014.

XIANG, Q.; LEE Y. Y.; TORGET, R. W. Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. In: Finkelstein M.; McMillan, J. D.; Davison B. H.; Evans B. **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. Biotechnology for Fuels and Chemicals (The Twenty-Fifth Symposium)**. Humana Press, Totowa, NJ, 2004

YANG, N.; ZHANG, H.; CHEN, M.; SHAO, L.; HE, P. Greenhouse Gas Emissions from MSW incineration in China: Impacts of Waste Characteristics and Energy Recovery. **Waste Management**. v. 32, 2012.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. October 2015, p. 475–501, 2017.

ZHANG, C.; SU, H.; TAN, T.. Batch and semi-continuous anaerobic digestion of food waste in a dual solid–liquid system. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 10–16, 2013.

ZHANG, X.; RICHARD, T. Dual enzymatic saccharification of food waste for ethanol fermentation. **2011 International Conference on Electrical and Control Engineering**. Anais IEEE, set. 2011.