

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS
QUÍMICOS

CAMILA VERÍSSIMO DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
BIODIGESTÃO ANAERÓBICA**

TOLEDO
2017

CAMILA VERÍSSIMO DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
BIODIGESTÃO ANAERÓBICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney.

TOLEDO
2017

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Camila Veríssimo de Camargo

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
BIODIGESTÃO ANAERÓBICA**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Câmpus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.¹

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sidney (Orientador - UTFPR - Toledo)

Prof. Dr. Renato Eising (UTFPR - Toledo)

Prof. Dra. Karina Graziella Fiametti Colombo (UTFPR - Toledo)

Toledo
Junho de 2017

¹ A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

CAMARGO, V. C. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR BIODIGESTÃO ANAERÓBICA. 2017. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

RESUMO

A tendência global para o aumento da utilização de matérias-primas renováveis, o bagaço da cana de açúcar tem se mostrado importante. Este resíduo é considerado uma matéria-prima versátil para a indústria de fermentação para obtenção de produtos via química verde. Uma das etapas da fermentação anaeróbica, a acidogênese, caracteriza-se por ser um processo bioquímico em que as bactérias obtêm energia transformando matéria orgânica hidrolisada em compostos mais simples. Neste contexto, o objetivo deste trabalho visou a obtenção de ácidos graxos voláteis (AGVs) via fermentação anaeróbica do bagaço de cana-de-açúcar como substrato e diferentes consórcios microbianos, além de uma cepa pura, como inóculos. A celulose e hemicelulose presentes no substrato tiveram seus percentuais estimados por análise gravimétrica e os AGVs foram quantificados por HPLC. Obteve-se resultados satisfatórios, uma média de 22,5 g/L de AGVs e 1,8 g de AGVs/g de carboidrato.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, bagaço de cana-de-açúcar, consórcios microbianos, biodigestão anaeróbica.

CAMARGO, V. C. EVALUATION OF THE PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS BY ANAEROBIC BIODIGESTION. 2017. Graduation work. Federal Technological University of Paraná.

ABSTRACT

The global trend towards increase the use of renewable raw materials, sugarcane bagasse has been shown to be important. This residue is considered a versatile raw material for the fermentation industry, to obtain products via green chemistry. One of the stages of anaerobic fermentation, acidogenesis, is characterized by being a biochemical process in which the bacteria obtain energy transforming hydrolyzed organic matter into simpler compounds. In this context, the objective of this work was to obtain volatile fatty acids (VFAs) via anaerobic fermentation of sugarcane bagasse as substrate and different microbial consortia, in addition to a pure strain such as inocula. The cellulose and hemicellulose present in the substrate had their percentages estimated by gravimetric analysis and the AGVs were quantified by HPLC. Satisfactory results were obtained, a mean of 22.5 g / L of AGVs and 1.8 g of AGVs / g of carbohydrate. The results obtained were even more significant in the absence of pre-treatment for the substrate, which on a large scale would reduce time and cost.

Key words: volatile fatty acids, sugarcane bagasse, microbial consortia, anaerobic biodigestion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
2.1 ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	08
2.2 O BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR	09
2.2.1 Obtenção do bagaço	09
2.2.2 O bagaço de cana-de-açúcar como biomassa	09
2.2.3 Composição química do bagaço	11
2.2.3.1 Celulose.....	11
2.2.3.2 Hemicelulose	12
2.2.3.3 Lignina	13
2.2.3.4 Extrativos e cinzas.....	14
2.3 BIODIGESTÃO ANAERÓBICA	14
2.3.1 Hidrólise.....	15
2.3.2 Acidogênese	16
2.3.3 Acetogênese.....	16
2.3.4 Metanogênese	17
2.4 ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS	17
2.4.1 Ácido Acético	18
2.4.2 Ácido Butírico	19
2.4.3 Ácido Propiônico.....	20
2.4.4 Ácido Lático	20
2.4.5 Ácido Fórmico.....	21
2.4.6 Ácido Succínico	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 CONSÓRCIOS MICROBIANOS.....	23
3.2 SUBSTRATO.....	24
3.3 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO	24
3.4 FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA.....	24
3.4.1 Avaliação da produção de gás e adaptação dos microorganismos	24
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS	25
3.5.1 Preparo das amostras	25
3.5.2 Preparo de padrões e construção da curva de calibração.....	25
3.5.3 Leitura das amostras	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5 CONCLUSÃO	33

1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população humana e da economia global levou à geração massiva de resíduos. A gestão apropriada destes resíduos é crucial para minimizar a degradação do meio ambiente e promover a transição para uma sociedade sustentável. Entretanto, a gestão convencional se concentra principalmente em atender as regulações ambientais, negligenciando o potencial dos resíduos como matérias-primas para a produção de produtos químicos com valor agregado (LEE et al., 2014).

Atualmente, o desenvolvimento de componentes básicos para a síntese orgânica pode ser obtido a partir da biomassa, e subsequentemente convertido em vários produtos químicos de alto valor e outros materiais. Estes componentes básicos são moléculas com vários grupos funcionais que podem ser transformadas em novos grupos de moléculas utilizáveis (SAUER, et al; 2008).

Os ácidos carboxílicos são utilizados em larga escala na indústria química e de alimentos. Muitos destes ácidos podem ser convenientemente produzidos a partir de matérias-primas ricas em carboidratos por fermentação (Goldberg et al., 2006; Sauer et al., 2008; Straathof, 2014; Yang et al., 2007).

Na tendência global para um aumento da utilização de matérias-primas renováveis, o bagaço da cana de açúcar tem se mostrado importante. O açúcar da cana, sacarose, é considerado uma matéria-prima versátil para a indústria de fermentação, para se obter produtos via química verde. (GROOT; BORÉN, 2010).

Em sua composição o bagaço contém cerca de 50% de celulose, 30% de hemicelulose e 2,4% de cinzas. Assim, o uso do bagaço apresentam numerosas vantagens em comparação com outros resíduos de culturas (palha de arroz e palha de trigo, por exemplo, apresentam 17,5% e 11,0% de celulose, respectivamente) para uso em processos de bioconversão utilizando culturas microbianas (PANDEY; SOCCOL, 2004).

Os ácidos graxos voláteis (AGV) podem ser obtidos por meio do processo fermentativo a partir de resíduos da agroindústria, lodos e vários rejeitos orgânicos biodegradáveis. A utilização de AGVs para vários propósitos permitiu uma nova alternativa ao tratamento de resíduos via fermentação anaeróbica, oferecendo uma plataforma economicamente e ecologicamente sustentável (GOLUB et al.,

2011). Estes ácidos têm uma ampla gama de aplicações, tais como a produção de bioplásticos (CAI et al., 2009) e produção de bioenergia (UYAR et al., 2009; CHOI et al., 2011). A produção comercial de AGVs é, sobretudo, realizada por rotas químicas (HUANG et al., 2002). Contudo, o uso de produtos petroquímicos não-renováveis colocou em destaque as rotas biológicas de produção (AKARAONYE et al., 2010).

Já é praticada em grande escala a produção de ácido cítrico, ácido láctico, D-glucónico, ácido itacónico e ácido 2-ceto-L-gulónico. A produção de ácido succínico está atualmente sendo realizada por diversas empresas (McCoy, 2009), enquanto que outros ácidos, anteriormente não disponíveis por fermentação, tal como o ácido 3-hidroxipropiónico (Della Pina et al., 2011) e ácido adípico (Beardslee e Picataggio, 2012) estão em estágios avançados de desenvolvimento industrial e provavelmente serão comercializados nos próximos anos.

Sob uma perspectiva a longo prazo, isto ajudaria na utilização de vários resíduos gerados pelas sociedades e os converteria em produtos químicos com valor agregado (LU et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir ácidos graxos voláteis por via biotecnológica a partir do bagaço de cana residual da indústria de produção de álcool e açúcar, além de bioprospectar microorganismos capazes de fermentar anaerobicamente o bagaço de cana e avaliar o potencial dos diferentes consórcios microbianos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma gramínea do gênero *Saccharum spp* e possui grande importância econômica para o Brasil. É fonte de matéria-prima para a produção de açúcar e álcool, possuindo papel significativo no mercado interno e externo (UNICA, 2014).

A *Saccharum spp* tem sua origem na ilha de Papua Nova Guiné. Lá, era utilizada de forma ornamental, enfeitando jardins e moradias, e também crescia em meio silvestre. Após o início das migrações náuticas dos habitantes do Oceano Pacífico, a cultura se disseminou em várias ilhas do sul do Pacífico, na Indochina, no Arquipélago da Malásia e em Bengala, sendo certo o seu aparecimento como planta produtora de açúcar na Índia (MIRANDA, 2008).

No Brasil, as primeiras mudas de cana-de-açúcar chegaram em 1532, trazidas por Martim Afonso de Souza da ilha da Madeira e Açores, ambiente com condições climáticas muito similares às do Brasil. Este fato impulsionou a criação dos primeiros engenhos de açúcar no país (MIRANDA, 2008; RIPOLI et al., 2006).

Até a década de 1970 o cultivo de cana-de-açúcar era em grande parte destinado à produção de açúcar (VEIGA et al., 2006). Este cenário mudou quando em 1975 o governo criou o Programa Nacional do Álcool – Proálcool. O objetivo era criar uma alternativa ao petróleo, dada a dependência externa por este combustível fóssil e o alto preço do barril na época (SZMRECSÁNYI e MOREIRA, 1991). Os resultados foram positivos, a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar aumentou de 600 milhões de litros em 1975 para 3,4 bilhões de litros em 1976 (BORGES et al., 1988).

O volume de produção de etanol superou o de açúcar a partir da década de 80 em decorrência do Proálcool e do aumento da demanda por veículos movidos a álcool. De 1983 a 1989 houve uma maior porcentagem de vendas de carros a álcool em detrimento dos movidos à gasolina, o que influenciou diretamente no consumo de álcool hidratado (VEIGA et al., 2006).

Segundo o CONANA (2017), a safra 2016/17 chegou a 657 milhões de toneladas, e a estimativa para a próxima é que chegue a 691 milhões. No ano de 2016 a produção de açúcar chegou a 33,5 milhões de toneladas e o álcool a 30,5

bilhões de litros.

Por apresentar grande extensão territorial, o Brasil possui condições climáticas variadas, o que incorre na existência de dois períodos de safra distintos. De abril a novembro a região centro-sul colhe sua safra, e de novembro a abril é o período da região norte-nordeste. Essa característica é interessante não só em se tratando de diversificação geográfica, mas de maior equilíbrio na safra também (ALFONSI et al., 1987).

2.2 O BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

2.2.1 Obtenção do bagaço

A cana-de-açúcar utilizada no processo de produção do álcool e do açúcar é transportada do canavial para as usinas através de caminhões. Antes de ser descarregada é amostrada, visando determinar a massa dos colmos (tipo de caule) e o seu respectivo teor de sacarose (PAYNE, 1989).

As etapas de produção subsequentes correspondem à lavagem da cana, seguida de desintegração parcial do colmo, de modo a facilitar o processo de extração da sacarose, e extração do caldo. Este pode ser realizado em difusores ou a partir do esmagamento da cana por cilindros metálicos, chamados de moendas. Visando o aumento da eficiência da extração da sacarose realiza-se a embebição, que é a adição de água ou caldo à matéria submetida à moagem. É nesta etapa do processo que o bagaço da cana-de-açúcar é disponibilizado (PAYNE, 1989).

Macedo, Leal e Silva (2004) estimam que o índice de produção de bagaço pode chegar a 280 kg por tonelada de cana moída, com 50% de umidade e poder calorífico inferior da ordem de 7.500 kJ/kg. Segundo Lora (2008), o processamento gera na ordem de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (ambos em base seca).

2.2.2 O bagaço de cana-de-açúcar como biomassa

Hoje em dia, o interesse pela aplicação da digestão anaeróbia é

confirmado pelos inúmeros trabalhos publicados na literatura pertinente. Este interesse se deve em grande parte à crise energética, devido ao aumento do preço dos combustíveis fósseis, conjunto com o aumento da demanda por energia, e também ao desenvolvimento de uma consciência ambiental além do desenvolvimento de modelos de biodigestores mais avançados e mais eficientes (FERNADEZ JUNIOR, 2001; BRAUN et al., 2010).

Esses aspectos permitiram o uso mais amplo desse tipo de tratamento, englobando agora não somente resíduos urbanos e rurais, mas também agroindustriais, (FERNADEZ JUNIOR, 2001; BRAUN et al., 2010), onde a digestão anaeróbia destaca-se devido as suas diversas características favoráveis, como baixa produção de sólidos; baixo consumo de energia; baixos custos de implementação, manutenção e operação, tolerância a elevadas cargas orgânicas, degradação de certos compostos tóxicos e possibilidade de operação com elevados tempos de detenção hidráulica (AQUINO & CHERNICARO, 2005).

Alguns resíduos agrícolas que são substratos potenciais para produção de ácido láctico, por exemplo, são: lignocelulose / hemicelulose hidrolisada (KAREL et al., 1997), casca de algodão, espiga e caules de milho (VICKROY, 1985), beterraba, melaço (GOKSUNGUR & GUVENC, 1999; KOTZAMANIDIS et al., 2002), bagaço de cana de açúcar (XAVIER & LONSANE, 1994), bagaço de mandioca (ROJAN et al., 2005), celulose (VENKATESH, 1997), cenoura (PANDEY et al., 2001), melaço gasto em lavagem (SHARMA et al., 2003), fibra de milho hidrolisado (SAHA & NAKAMURA, 2003) e farelo de trigo (JOHN et al., 2006).

O bagaço é responsável por 25-30% em peso de cana moída, equivalente a algo entre 74 e 88 milhões de toneladas produzidos por ano no Brasil (BUCKERIDGE, 2010). Por se tratar de grande quantidade de biomassa disponível, devem-se buscar outras aplicações para este resíduo, além das já conhecidas cogeração e produção de etanol de segunda geração. (PARENTE, 2007). Há várias aplicações alternativas possíveis para esse bagaço excedente, tais como produção de polpa celulósica para produção de papel, ácidos orgânicos, ração animal e compósitos (LOBO et al., 2007).

Pelo elevado conteúdo de carbono e presença de nutrientes, como fósforo, nitrogênio e enxofre, outra forma de agregar valor econômico ao resíduo é a sua aplicação como substrato para o crescimento de micro-organismos na geração de ácidos graxos voláteis, como os ácidos acético, butírico e propiônico (JOHN et al.,

2007).

2.2.3 Composição química do bagaço

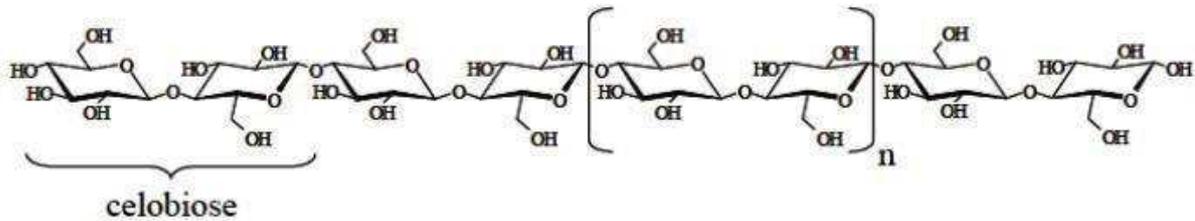
A variedade da cana empregada e a localização geográfica dos locais de cultivo podem acarretar em pequenas variações na composição química do bagaço. A celulose, hemicelulose e lignina são os principais componentes macromoleculares do bagaço. A celulose é o principal componente da parede celular e representa 41 a 44% do bagaço, a lignina representa de 20 a 22%, as polioses representam 25 a 27% e o restante, cerca de 10%, são componentes minoritários de baixo peso molecular, extrativos e substâncias minerais (ICIDCA, 1990).

2.2.3.1 Celulose

O principal componente da parede celular vegetal é a celulose $((C_6H_{10}O_5)_n)$. É um homopolissacarídeo linear constituído de unidades do monossacarídeo β -D- glicopiranosose unidas por ligações β -(1-4) glicosídicas, sendo a celobiose (dímero de glicose) sua unidade repetitiva (FENGEL; WEGENER, 1989). A estrutura das plantas é decorrente deste componente que se encontra entrelaçado por polissacarídeos e impregnado com lignina (GOLDSTEIN, 1981).

Há a formação de regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas nas cadeias de celulose. As regiões cristalinas se apresentam de maneira mais organizada e regular, o que confere resistência e proteção à célula; já as regiões com uma menor orientação entre as moléculas são conhecidas como regiões amorfas, e são mais susceptíveis a degradação (FENGEL; WEGENER, 1989). Na figura 1 é apresentada a cadeia da celulose.

Figura 1 - Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose



Fonte: Tímár-Balázsy e Eastop (1998).

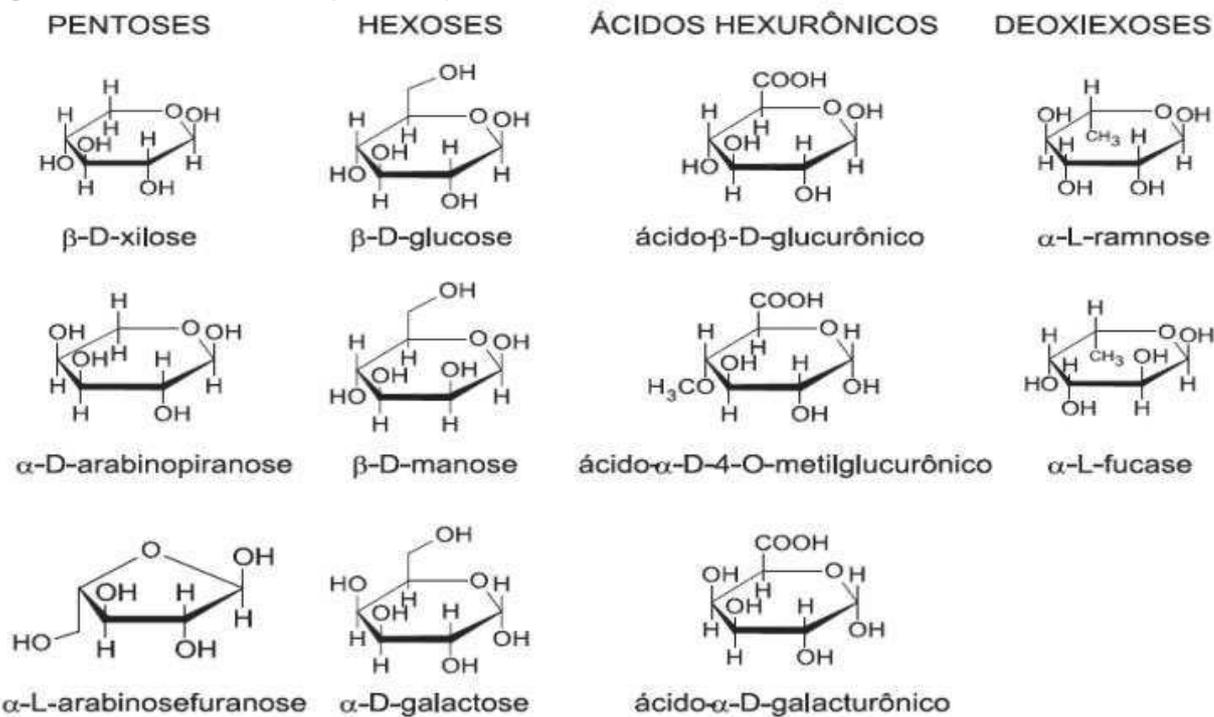
2.2.3.2 Hemicelulose

O segundo polissacarídeo natural mais abundante nos vegetais, depois da celulose, é a hemicelulose (BISARIA, GHOSE, 1981). Diferente da celulose, é um heteropolissacarídeo amorfo formado por cadeias lineares com ramificações laterais, sendo compostas por hexoses, pentoses e ácidos urônicos. As unidades de pentose (açúcares de cinco carbonos), como arabinose e xilose e unidades de hexose (açúcares de seis carbonos) como glicose, manose, galactose são polímeros complexos que mantêm ligações cruzadas entre si por pontes de hidrogênio conferindo resistência aos materiais lignocelulósicos (FASANELLA, 2008).

As cadeias principais de hemiceluloses podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas (xilose), ou por duas ou mais unidades, como as glucomananas (glicose e manose). A principal hemicelulose da cana-de-açúcar são as glucuronoarabinoxilanos (GAXs), que possuem cadeia principal de xilose com ramificações de ácido glucurônico e arabinose. Também são encontrados nos tecidos de cana, em grande quantidade, os β -glucanos (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

As hemiceluloses são mais susceptíveis ao processo de hidrólise que a celulose devido ao seu caráter relativamente amorfo e seu grau de polimerização inferior e mais oxidável do que a lignina. Ainda difere da celulose devido a presença de ramificações e na heterogeneidade de sua formação (GOLDESTEIN, 1981). Na figura 2 é apresentada a estrutura da celulose.

Figura 2 - Carboidratos que compõem as unidades de hemicelulose



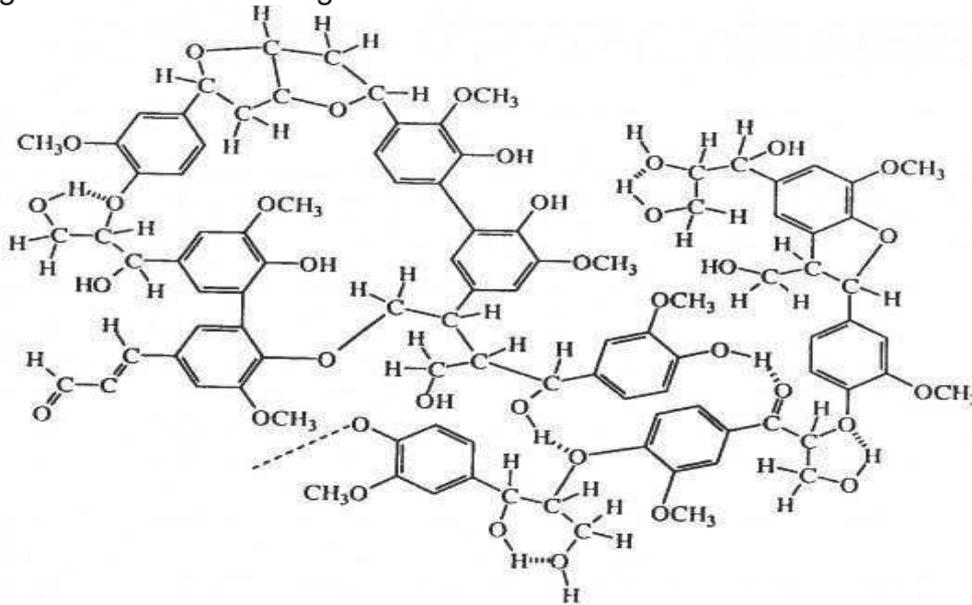
Fonte: Rodrigues e Camargo (2008).

2.2.3.3 Lignina

Outro componente do bagaço de cana-de-açúcar é a lignina. Sua cadeia é composta por unidades de fenilpropano decorrente da polimerização oxidativa, e tem estrutura hidrofóbica e complexa (CURVELO, 1992). É uma macromolécula heterogênea formada por ligações éter (HIGUCHI, 1982).

A dificuldade de conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis se deve, principalmente, a lignina, que funciona como barreira natural à degradação, tanto enzimática como microbiana, resultando no aumento de sua concentração com o desenvolvimento da planta, dando a esta a capacidade de sustentação (HIGUCHI, 1982). Na figura 3 é mostrada a estrutura da lignina.

Figura 3 - Estrutura da lignina



Fonte: Sjöström (1992).

2.2.3.4 Extrativos e cinzas

Os extrativos são compostos orgânicos de baixa massa molecular e podem ser extraídos com solvente orgânico ou água. Características como cor, cheiro, sabor e propriedades abrasivas decorrem da presença desses materiais. Ácidos graxos, ceras, terpenos, óleos essenciais, compostos aromáticos e sacarose residual são os extrativos mais comumente encontrados (D'ALMEIDA, 1988).

Componentes inorgânicos (cinzas) também fazem parte da biomassa e exercem importante papel no metabolismo das plantas. São constituídos principalmente por potássio, cálcio, manganês, sulfatos, carbonatos e silicatos (CURVELO, 1992).

2.3 BIODIGESTÃO ANAERÓBICA

Considera-se a digestão anaeróbia de resíduos orgânicos um processo bioquímico no qual diferentes microrganismos, na ausência de oxigênio molecular, produzem biogás, composto em maior proporção de metano e dióxido de carbono (FORESTI et al., 1999).

Segundo Azevedo (2010) o processo de fermentação anaeróbia exige

condições adequadas para seu metabolismo, sendo necessário proporcionar condições favoráveis tais como: fonte de energia, carbono para a síntese de novo material celular e elementos inorgânicos (nutrientes), como o nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio e magnésio.

A biodigestão anaeróbia é dividida em quatro estágios, sendo eles hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, sendo que para cada estágio estão envolvidas diferentes populações microbianas (STEIL, 2001).

De acordo com Lu et al. (2011), a maioria dos processos biotecnológicos utilizam cultura pura para promover a fermentação, pois os parâmetros dos processos podem ser otimizados para cepas específicas de microrganismos. Entretanto, a fermentação sobre cultura pura possui uma desvantagem fundamental: tal processo requer condições de operação estéreis e elevada qualidade do material.

Por outro lado, uma cultura mista não requer cepas específicas e podem ser operados em condições não-estéreis sem risco significativo de contaminação (LU et al., 2011). Além do mais, a cultura mista é capaz de consumir um amplo espectro de substratos contendo diversos compostos químicos e que, devido a estas características, a cultura mista pode ser alimentada com diversos resíduos orgânicos (RODRIGUEZ et al., 2006).

O processo de degradação de matéria orgânica em ambientes livres de oxigênio por consórcios microbianos envolve a cooperação de uma população de microorganismos que geram uma fermentação estável e auto-reguladora (STERLING, et al., 2001).

2.3.1 Hidrólise

Na fase de hidrólise as bactérias anaeróbias facultativas (bactérias hidrolíticas) transformam as moléculas orgânicas em compostos simples e solúveis de menor peso molecular (monômeros) e através de enzimas extracelulares os convertem em acetato, hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e outros produtos como glicose (CHERNICHARO, 1997).

2.3.2 Acidogênese

A acidogênese caracteriza-se por ser um processo bioquímico em que as bactérias obtêm energia transformando matéria orgânica hidrolisada em compostos mais simples (CHERNICHARO, 1997).

Estes compostos são, por exemplo, CO₂, H₂, etanol, propanol, butanol, metanol, glicerina e acetona, ácido acético (CH₃COOH), propiônico (CH₃CH₂COOH), butírico (CH₃CH₂CH₂COOH), fórmico (HCOOH) e láctico (CH₃CHCOOH) (Boubaker, 2008). Estes produtos metabólicos são a base do consumo das bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas, segundo Chernicharo (1997).

2.3.3 Acetogênese

Na terceira fase, os ácidos graxos e o etanol formados são transformados pelas bactérias acetogênicas, produtoras de acetato e hidrogênio. É nesta fase que ocorre a conversão dos produtos gerados na acidogênese em compostos que formam os substratos para a produção de metano. A função desses microrganismos é degradar esses ácidos graxos e álcoois dando origem a acetato, H₂ e CO₂ (LABIB et al. 1992).

Segundo VAN HAANDEL e LETTINGA (1994), se por alguma razão a taxa de remoção de ácidos voláteis através da metanogênese não acompanha a taxa de produção dos mesmos pode surgir uma situação de instabilidade, com a produção líquida de ácidos, resultando na diminuição do valor do pH. Tal fato pode causar uma redução na atividade metanogênica e um aumento na produção líquida de ácido, ocasionando o que se denomina de acidificação do conteúdo do reator.

Neste processo o hidrogênio desempenha um papel fundamental uma vez que a reação só ocorrerá se a pressão parcial do hidrogênio for suficientemente baixa de modo a permitir a conversão de todos os ácidos. Esta diminuição da pressão parcial do hidrogênio está a cargo de bactérias que o consomem (Deublein & Steinhauser, 2008).

2.3.4 Metanogênese

O metano é produzido por duas vias metabólicas principais: hidrogenotrófica e acetotrófica (ou acetoclástica). As arqueias hidrogenotróficas são autótrofas, reduzindo CO_2 a metano e usando H_2 como doador de elétrons, liberando H_2O . As arqueias acetoclásticas são heterótrofas, produzindo o metano e CO_2 a partir da redução do acetato. É conhecido que cerca de 70% do metano produzido nestes sistemas é resultante da degradação de acetato (JETTEN et al., 1992; CHERNICHARO, 2007; YU et al., 2005).

Os grupos bacterianos envolvidos no processo geral da biodigestão anaeróbica estão misturados e esta diversidade depende basicamente do tipo de matéria orgânica adicionada ao digestor. As bactérias formadoras de ácidos são bastante resistentes e capazes de suportar súbitas mudanças das condições externas e de alimentação, ao contrário das bactérias metanogênicas, bastantes susceptíveis a alterações nas condições (LABIB et al. 1992).

2.4 ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS

Ácidos graxos voláteis são ácidos graxos de cadeia curta contendo de seis ou menos átomos de carbono (ácidos acético, propiônico, butírico, etc) que podem ser produzidos sinteticamente a partir de combustíveis fósseis ou intermediários metabólicos da etapa de acidificação (fermentação) do processo de digestão anaeróbica (SINGHANIA et al., 2013).

Na produção por via biológica, carboidratos (glucose e sacarose) vêm sendo empregados como principais fontes de carbono, entretanto, tal fato levanta questões éticas sobre o uso de alimentos para produção de produtos químicos. Este problema pode ser solucionado utilizando rejeitos ricos em matéria orgânica, como lodos gerados pelas estações de tratamento, resíduos de alimentos, fração orgânica de resíduos sólidos municipais e efluentes industriais, para a produção de ácidos graxos voláteis, oferecendo uma plataforma economicamente e ecologicamente sustentável e que agrega valor (LEE et al., 2014)

De maneira geral, segundo Lee et al. (2014), a produção de ácidos graxos voláteis derivados de resíduos orgânicos é um processo anaeróbico que

envolve a hidrólise e acidogênese (e posterior fermentação acidogênica).

Segundo Singhanian et al. (2013), o processo de fermentação, empregando recursos renováveis, é preferível do ponto de vista do desenvolvimento sustentável e da saúde humana.

Os ácidos graxos voláteis produzidos por meio da fermentação acidogênica de resíduos são substratos valiosos para uma ampla variedade de aplicações. Ácidos orgânicos – ácidos acético, butírico, propiônico e láctico – vêm sendo comumente investigados como precursores de várias aplicações biotecnológicas (MOTTE et al., 2015), tais como na produção de plásticos biodegradáveis (poli- hidroxialcanoatos); geração de bioenergia – biogás, bio-hidrogênio e biodiesel – e eletricidade (células de combustível microbianas). Geralmente é viável e altamente desejável utilizar o resíduo fermentado rico em ácidos graxos voláteis diretamente nestas aplicações, entretanto, para algumas aplicações, o resíduo fermentado deve ser tratado para melhorar suas características (LEE et al., 2014).

2.4.1 Ácido Acético

O ácido acético é um dos mais simples ácidos carboxílicos. Este ácido fraco de coloração transparente é caracterizado pelo seu gosto azedo e odor pungente. Atualmente, o ácido acético é considerado como um intermediário chave para muitas indústrias dos ramos químico, limpeza, madeira e alimentício. Trata-se de um composto intermediário para as indústrias na produção de diferentes produtos químicos, tais como o polímero acetato de vinila, acetato de celulose, ácido tereftálico, dimetil tereftalato, ácido acético anidro e acetato de cálcio. Todos estes produtos são gerados a partir do ácido acético derivado do petróleo (KIM et al., 2002).

Apesar do fato do processo biológico de produção de ácido acético contar apenas 10 % do mercado de produção global, este ainda se mantém como um importante processo para muitos países que estipulam que a produção de vinagre deve ser feita a partir de origem biológica. Portanto, a otimização do processo de produção do ácido acético é uma das mais importantes pesquisas industriais e objeto de estudo para muitos grupos de pesquisa (AWAD et al., 2012).

As bactérias ácido-acéticas são conhecidas por possuírem habilidade de fermentação única, denominada “fermentação oxidativa” - oxidação incompleta onde os substratos são oxidados gerando produtos que são liberados no meio de cultura. O exemplo mais típico e a característica mais importante das bactérias ácido-láticas é o da fermentação oxidativa para a produção de ácido acético do etanol (SAICHANA et al., 2015). Entre os vários gêneros, a *Acetobacter spp.* e *Komagataeibacter spp.* são as bactérias utilizadas com mais frequência devido à elevada resistência ao etanol e ácido acético, que é muito importante para a produção industrial de vinagre (GULLO et al., 2014).

Entretanto, Saichana et al. (2015) citam um leque de gêneros e espécies de bactérias ácido-acéticas, apresentando várias pesquisas e trabalhos publicados que concernem sobre a versatilidade e aplicações no campo da biotecnologia.

2.4.2 Ácido Butírico

O ácido butírico, um ácido graxo de cadeia curta (4 átomos de carbono), é amplamente utilizado pelas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, e possui importantes aplicações nos mercados de solventes, polímeros e de produtos químicos em geral (ZHANG et al., 2009).

A produção industrial deste ácido é baseada na síntese química (oxosíntese) a partir de derivados gerados pelas indústrias petroquímicas. Entretanto, com o aumento do preço do petróleo, preocupações com a poluição ambiental causada pelos petroquímicos, e pela preferência do consumidor por ingredientes naturais em alimentos, cosméticos e fármacos, a produção de ácido butírico a partir de biomassa renovável tem se tornado uma alternativa atrativa (ZIGOVA; STURDIK, 2000), despertando o interesse de pesquisadores com foco nas tecnologias de fermentação microbiológica, por exemplo.

Sjöblom et al. (2015) citam autores que estudaram a produção de biocombustíveis promissores por meio de processos enzimáticos, onde foi reportado que os melhores rendimentos e concentrações de butirato foram obtidos com a bactéria anaeróbica *Clostridium tyrobutyricum*.

2.4.3 Ácido Propiônico

O ácido propiônico é largamente empregado como um antifúngico e flavorizante em alimentos, grãos e ração e como um intermediário na síntese de herbicidas, plásticos, propionato, solventes e fármacos. A síntese química a partir do petróleo é a principal fonte de ácido propiônico. Os processos de fermentação utilizando subprodutos industriais de baixo custo como fontes de carbono pode ser uma alternativa atraente (KOSMIDER et al., 2010).

De acordo com Kumar e Babu (2006), as bactérias ácido-propiônicas vêm sendo utilizadas diariamente nas indústrias, pois exercem importante papel no desenvolvimento do sabor característico dos queijos suíços. Entretanto, a rota da fermentação convencional para a produção de ácido propiônico é ineficiente e compete com dificuldades com as rotas de sínteses químicas, pois a produção apresenta baixa taxa de fermentação e baixas concentrações do produto e, além do mais, pela fermentação ser heterogênea, o propionato é produzido juntamente com outros subprodutos que podem dificultar a purificação e encarecer o valor do produto final.

A fim de se estudar uma rota fermentativa economicamente viável, é necessário desenvolver processos que empreguem bioreatores de alta eficiência e técnicas de separação (KUMAR; BABU, 2006).

2.4.4 Ácido Láctico

Ácido láctico (2-hidroxi-propiônico, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) é o ácido orgânico mais amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e química. Sua produção têm atraído uma grande quantidade de pesquisas. Uma aplicação emergente é utilizando-o como fonte de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, uma opção ecologicamente alternativa aos materiais provenientes de fontes petroquímicas (DATTA; HENRY, 2006).

O ácido láctico existe em duas formas, D(-)-ácido láctico e L(+)-ácido láctico. Pode ser produzido comercialmente via síntese química ou fermentação. A síntese química resulta em uma mistura racêmica dos dois isômeros, enquanto que

por via fermentativa é possível produzir uma forma óptica pura de ácido láctico, dependendo dos microorganismos, substratos e condições de fermentação empregados (AKERBERG, C. et al., 1998).

Materiais ricos em açúcares, amido e lignocelulose são substratos que podem ser utilizados na produção fermentativa. A síntese química parte da hidrólise de compostos provenientes de processos petroquímicos, o que pode causar limitação devido à futura escassez dessas matérias-primas. As bactérias produtoras de ácido láctico têm grande interesse devido à elevada taxa de crescimento e rendimento de produto (CHOPIN, A., 1993).

2.4.5 Ácido Fórmico

O ácido metanóico ou ácido fórmico (CH_2O_2) é o mais simples ácido carboxílico por possuir apenas um carbono em sua estrutura. O ácido fórmico é um importante reagente em processos sintéticos, como a produção de aspartame (DALLATOMASINA, 1985), ou como agente conservante para alimentos (STRATFORD, 2003). O ácido fórmico também tem sido empregado como reagente para a produção de hidrogênio gasoso, que tem sido apontado como provável substituto de combustíveis fósseis, visto que o produto da sua queima com oxigênio é apenas água (TEDSREE, 2011).

2.4.6 Ácido Succínico

O ácido succínico é um ácido dicarboxílico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$) também conhecido como ácido butanodióico. Pode ser utilizado como precursor na obtenção de produtos químicos utilizados na agricultura, indústria de alimentos e química (ZEIKUS; JAIN; ELANKOVAN, 1999). É considerado hoje uma das substâncias químicas que apresenta maior potencial para ser produzida a partir de recursos renováveis via fermentação (JANG, et al., 2012).

A produção via fermentação tem ganhado destaque visto que a obtenção tradicional de ácido succínico depende principalmente da hidrogenação do anidrido maléico (um derivado do petróleo) que requer alta temperatura, alta pressão

e catalisadores caros no processo (ZEIKUS; JAIN; ELANKOVAN, 1999).

Estudos recentes têm apresentado relatos sobre a produção de ácido succínico a partir de fonte celulósicas baratas como vagens de alfarroba, palha de milho (ZHENG et al., 2010) e bagaço de cana-de-açúcar (ELCIO; NEI, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSÓRCIOS MICROBIANOS

Foram bioprospectados 4 consórcios microbianos a fim de serem utilizados como inóculos no processo de biodigestão anaeróbica, além da utilização de uma cepa pura (*Clostridium butyricum*). Os consórcios serão aqui tratados como: A – rúmem bovino proveniente do Frigorífico Bossoni, da cidade de Lupércio-SP; B – porção de terra amostrada a 15 cm da superfície do Jardim Zoobotânico Municipal de Toledo - PR; C – dejetos de pássaros provenientes de viveiro localizado no Jardim Zoobotânico Municipal de Toledo - PR; D – estômago suíno proveniente de frigorífico localizado em Santa Cruz do Rio Pardo - SP. Os consórcios foram convenientemente diluídos em água destilada.

3.2 SUBSTRATO

Como fonte de carbono e nitrogênio para a fermentação foi utilizado bagaço de cana proveniente de moedores de cana-de-açúcar da cidade de Toledo/PR. O preparo aplicado ao substrato foi secagem até massa constante e padronização de tamanho para pedaços de cerca 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura. Determinou-se sua umidade (ADOLFO LUTZ, 2008) e caracterizou-se quanto a percentuais de celulose+hemicelulose - método gravimétrico (VAN SOEST, 1967; MERTENS, 1997).

3.3 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo foi preparado conforme meio CAB (*Clostridium acetobutylicum* medium) modificado pela ausência de carbono. Utilizou-se água destilada, 4,0 g de extrato de levedura, 1,0 g de triptona, 1,5 g K₂HPO₄, 0,5 g de asparagina, 1 mL de 0,2 % (v/v) de resazurina, 0,1 g de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g de MnSO₄.H₂O, 15 mg FeSO₄.7H₂O e 0,1 g de NaCl.

3.4 FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA

O procedimento para a promoção da cultura anaeróbica foi baseado na técnica Balch (Balch et al., 1979). A remoção de oxigênio do meio de cultivo foi alcançada por ebulição sob um ambiente anóxico (atmosfera de CO₂) e adições de bicarbonato de sódio a 85 °C e cisteína a 65 °C foram feitas para diminuir o potencial redox do meio.

Os experimentos foram conduzidos em tubos Hungate de 15 mL, com volume de trabalho de 6 mL. À estes tubos foram adicionados 6 mL do meio de cultivo e 120 mg de substrato sob atmosfera de CO₂. Selou-se com tampas de rosca de baquelite e rolhas de borracha. Estes foram autoclavados e armazenados para uso posterior.

Os tubos contendo meio e substrato foram inoculados com 1 mL de consórcio microbiano (um tubo para cada consórcio) com auxílio de uma seringa por meio da rolha de borracha. O experimento foi incubado a 37 °C e manteve-se essa condição por 7 dias. Ao final do 7º dia 5 novos tubos foram inoculados com 1 mL dos tubos anteriores, caracterizando uma nova geração. Neste trabalho 5 gerações foram avaliadas.

3.4.1 Avaliação da produção de gás e adaptação dos microorganismos

Os tubos incubados tiveram sua produção de gás medida a cada dois dias utilizando-se uma seringa. A seringa era inserida pelas rolhas de borracha do tubo e a pressão do gás formado era capaz de impulsionar o êmbolo e assim o volume era medido. O objetivo foi avaliar sumariamente o desempenho do experimento e a adaptação do consórcio.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS

A produção de ácidos graxos voláteis, objetivo deste trabalho, foi quantificada em Cromatógrafo Líquido de alta eficiência (HPLC), marca Thermo Scientific, modelo ULTIMATE3000, tendo como referência padrões de concentrações

conhecidas.

3.5.1 Preparo das amostras

Com uma seringa foi retirado 1 mL de cada um dos 5 tubos da 5ª geração. Transferiu-se para eppendorfs e centrifugou-se por 3 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 um e transferido para novo eppendorf para posterior análise.

3.5.2 Preparo de padrões e construção da curva de calibração

Foram preparados padrões de ácidos butírico, láctico, acético, propiônico, succínico e fórmico em concentrações conhecidas, 0,5 g/L, 1,5 g/L, 3,0 g/L, para construção das curvas de calibração.

3.5.3 Leitura das amostras

A análise dos produtos de fermentação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Thermo Scientific, modelo ULTIMATE3000, equipado com detector UV-VIS. Uma coluna C18 de fase reversa da marca NST (125mm x 4,0mm x 5µm) foi utilizada para a separação dos ácidos graxos voláteis.

Como fase móvel utilizou-se uma mistura de água acidificada, pH 3, e metanol na proporção (1:20), a vazão foi de 0,5 mL/min, a leitura realizada a 210 nm, o tempo de corrida de 15 minutos e o volume de injeção de 10 uL (modificado de EMPTAGE et al, 2000).

Foi realizada também a análise de um branco constituído de meio não-fermentado. Os valores de AGVs encontrados foram descontados de todos os resultados encontrados para cepa e consórcios.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho o bagaço da cana-de-açúcar foi avaliado como substrato para a produção de AGVs com cadeias de 1 a 4 carbonos. A amostra de bagaço de cana empregada foi caracterizada com relação a sua composição fibrosa. Para isso, métodos gravimétricos foram empregados para estimar o percentual de celulose + hemicelulose, que são os componentes utilizados como substrato na fermentação. A concentração encontrada foi de 63,17% de celulose + hemicelulose. Na tabela 1 são apresentados os dados relatados pela literatura para fins de comparação.

Tabela 1 - Percentuais de celulose + hemicelulose no bagaço da cana-de-açúcar

	Celulose + Hemicelulose
Autor 1	70,39%
Autor 2	74,04%
Este trabalho	63,17%

Autor 1: CANDIDO A, R. G.; GANDOYA G. G.; GONÇALVES, A. R., 2017.

Autor 2: LANDELL et al., 2013.

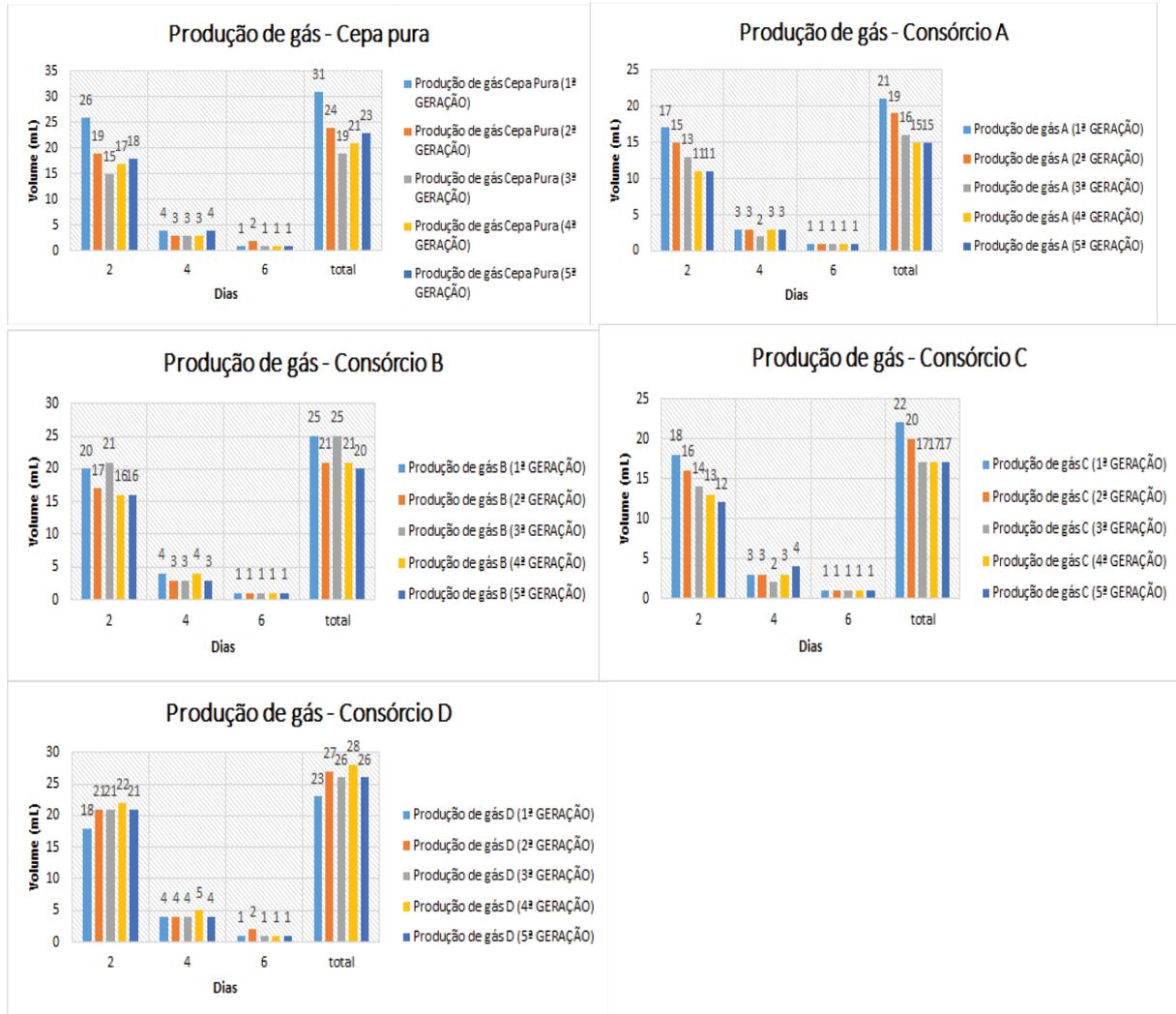
Fonte: autoria própria.

Nota-se que o valor encontrado neste trabalho se aproxima dos encontrados na literatura. Sendo a celulose e a hemicelulose as frações mais facilmente fermentescíveis no processo, o bagaço-de-cana se apresenta com potencial para produção de AGVs quando comparado com outras culturas como palha de arroz e trigo que apresentam 17,5% e 11,0% de celulose, respectivamente, contra os cerca de 40% de celulose encontrada no bagaço de cana (PANDEY; SOCCOL, 2004).

O processo de fermentação foi avaliado quanto a adaptação dos microrganismos ao novo meio e substrato. As 5 gerações apresentaram produção de gás semelhantes nos mesmos períodos de avaliação. Segundo SONG et al., (2014), existem muitas formas de interações de acordo com os modos de troca metabólica, incluindo comensalismo, sinergismo, mutualismo, competição, neutralismo, parasitismo e predação, etc. A interação estável geralmente se baseia na co-utilização de diferentes substratos no ambiente, conversão sequencial de substratos e reutilização.

Por se tratar de consórcios microbianos prospectados em meios de conhecida atividade anaeróbica é possível estabelecer relação quanto aos bons resultados, em termos de adaptação, que foram obtidos. Na figura 4 constam os valores obtidos na avaliação da adaptação da cepa pura e consórcios microbianos.

Figura 4 - Produção de gás durante o processo fermentativo pela cepa pura e consórcios microbianos A, B, C e D



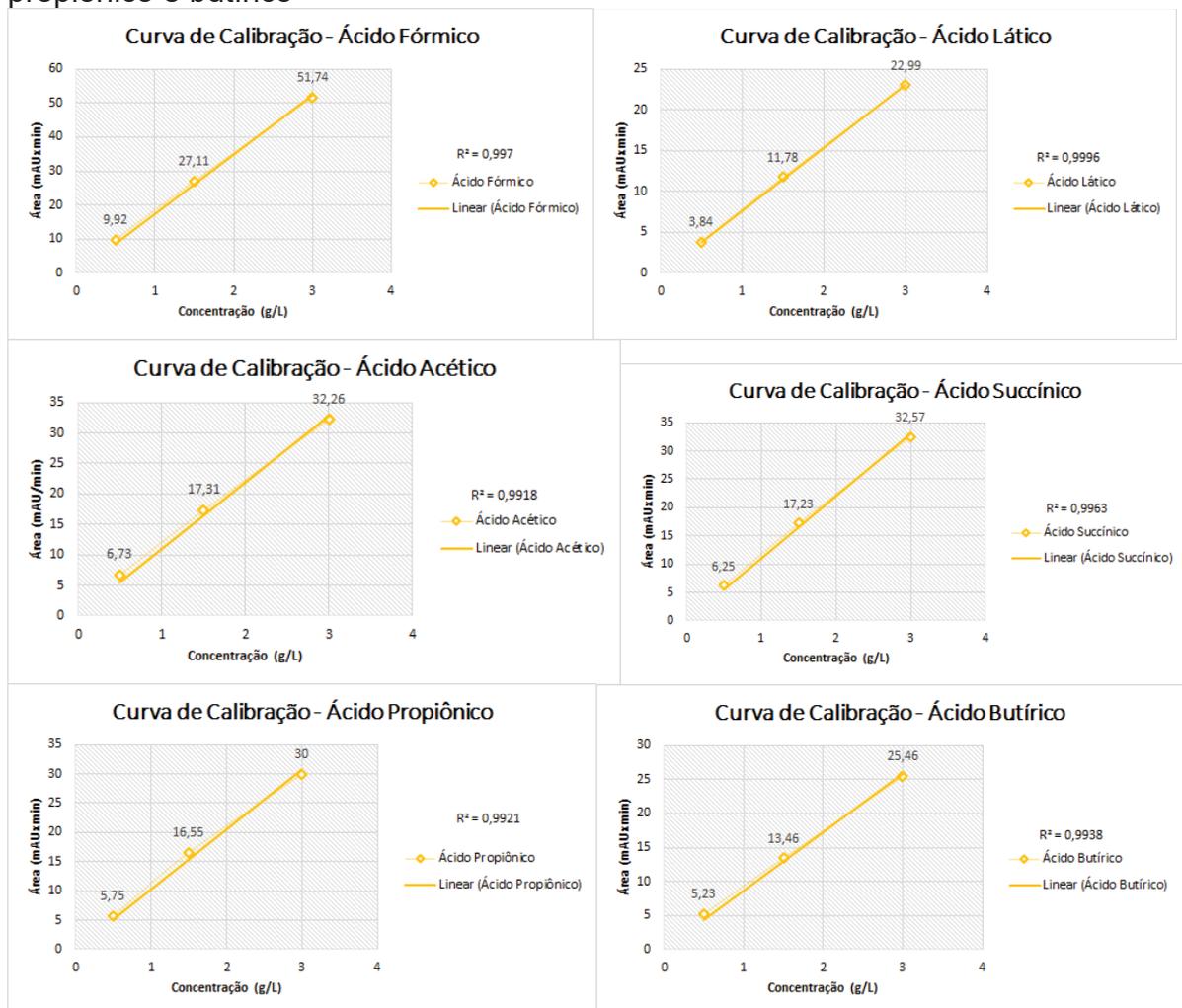
Fonte: autoria própria.

A partir da figura 4, em relação ao 2º dia de avaliação, percebe-se que a produção de gás apresenta maior variação nas 3 primeiras gerações de cada consórcio, adquirindo estabilidade na 4ª e 5ª gerações. Como exemplo tem-se os consórcios A e B com 11 mL e 16 mL, respectivamente, e os demais consórcios com variação de apenas 1 mL nas mesmas condições. Já no 4º e 6º dia as variações entre gerações são menores ainda.

As quantificações dos ácidos graxos voláteis foram realizadas mediante

uso de calibração externa para correlacionar concentração com sinal analítico. Para cada um dos ácidos foram estabelecidos gráficos de dispersão visando-se obter um modelo matemático que melhor se ajustasse aos valores de área (sinal analítico) em função da variação da concentração de AGVs. Uma medida do ajuste dessas curvas é o coeficiente de determinação (R^2), para o qual obteve-se neste estudo bons resultados, sendo 0,9918 o menor valor encontrado, o que demonstra a validade do modelo. A figura 5 mostra estes resultados.

Figura 5 - Curvas de calibração para os ácidos fórmico, láctico, acético, succínico, propiônico e butírico



Fontes: autoria própria.

A produção de AGVs por cada consórcio e pela cepa é apresentada na tabela 2, com os descontos do branco já considerados. A maior produção foi alcançada pelo consórcio D, com 26,678 g/L. Todos os consórcios e cepa, com exceção do consórcio C, apresentaram altos valores de concentração de ácido

acético. Por sua vez, o consórcio C, obteve bons resultados em relação a produção de ácido fórmico, enquanto que os demais, resultados moderados mas ainda significativos.

Tabela 2 - Produção de ácidos graxos voláteis

AGVs (g/L)	Consórcios microbianos				
	Cepa pura	A	B	C	D
Ácido Fórmico	1,607	3,174	7,432	18,834	4,996
Ácido Acético	13,542	16,636	12,106	-	18,441
Ácido Lático	-	-	-	1,686	-
Ácido Succínico	1,765	-	3,692	0,171	1,408
Ácido Butírico	1,349	1,330	1,238	1,525	1,833
Somatória	18,262	21,140	24,468	22,215	26,678

Fonte: autoria própria.

Os materiais lignocelulósicos não são os únicos que podem ser utilizados como substrato em processos de fermentação visando AGVs. DONGSHENG, et al. (2017) encontraram em seu trabalho valores como 7,28 g/L e 15,23 g/L de AGVs utilizando-se tofu e clara de ovo como substrato, respectivamente. Para esse trabalho foi utilizado pré-tratamento de explosão à vapor para o substrato e resíduo de reator UASB como inóculo.

Rúmen como inóculo em fermentação anaeróbica de palha de milho pré-tratada por explosão à vapor foi objeto de estudo de MURALI N.; FERNANDEZ S. e AHRING B. K. (2017) na produção de 22,8 g/L de AGVs e 4 g/L de ácido valérico. Já para REBECCHI et al. (2016) foram obtidos 19,8 g/L de AGVs. Sendo que 11,4 g/L, 0,9 g/L, 5,3 g/L e 0,3 g/L foram os resultados encontrados para ácido acético, propiônico, butírico e valérico, respectivamente. Neste caso utilizou-se bagaço de uva pré-tratado e inóculo acidogênico (REBECCHI, et al., 2016).

O ácido lático foi o único ácido produzido por apenas um consórcio (1,686 g/L), o C; o consórcio A não produziu ácido lático e succínico, e no entanto, apresentou ótima produção de acético (16,636 g/L); o ácido butírico foi produzido em menor proporção em comparação com os outros AGVs para todos os consórcios e cepa (uma média de 1,5 g/L).

Com os valores percentuais de celulose + hemicelulose e, uma vez que cada consórcio possuía 0,12 g de substrato disponível, foi possível encontrar qual a produção de AGVs em relação a fração que realmente é utilizada pelos

microrganismos na fermentação (celulose + hemicelulose). A maior produção de AGVs foi alcançada pelo consórcio D com 2,1114 g de AGVs / g de carboidrato. Todos os outros consórcios e cepa também tiveram resultados significativos, conforme é apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Produção de AGVs por cada consórcio a partir de celulose e hemicelulose e comparação

	Inóculo	Substrato	Pré-tratamento	AGVs totais (g/g de carboidrato)
Este trabalho	cepa pura	bagaço de cana	-	1,4454
	consórcio A	bagaço de cana	-	1,6734
	consórcio B	bagaço de cana	-	1,9368
	consórcio C	bagaço de cana	-	1,7586
	consórcio D	bagaço de cana	-	2,1114
Autor 1	fluido ruminal resíduo de	palha de milho biomassa	explosão à vapor	1,7900
Autor 2	biodigestor	lignocelulósica	cal modificada	0,5000

Autor 1: MURALI, N.; FERNANDEZ, S.; AHRING B. K., 2017.

Autor 2: KIM et al., 2013.

Fonte: autoria própria.

MURALI, N.; FERNANDEZ, S. e AHRING B. K. (2017) encontraram em seu trabalho 1,79 g/g de carboidrato utilizando-se palha de milho e fluido ruminal como inóculo, enquanto que neste trabalho foram encontrados valores semelhantes e até maiores, como é o caso da produção pelo consórcio D. Nesta comparação vale salientar que não foi utilizado nenhum tipo de pré-tratamento para tornar o substrato empregado mais acessível à fermentação.

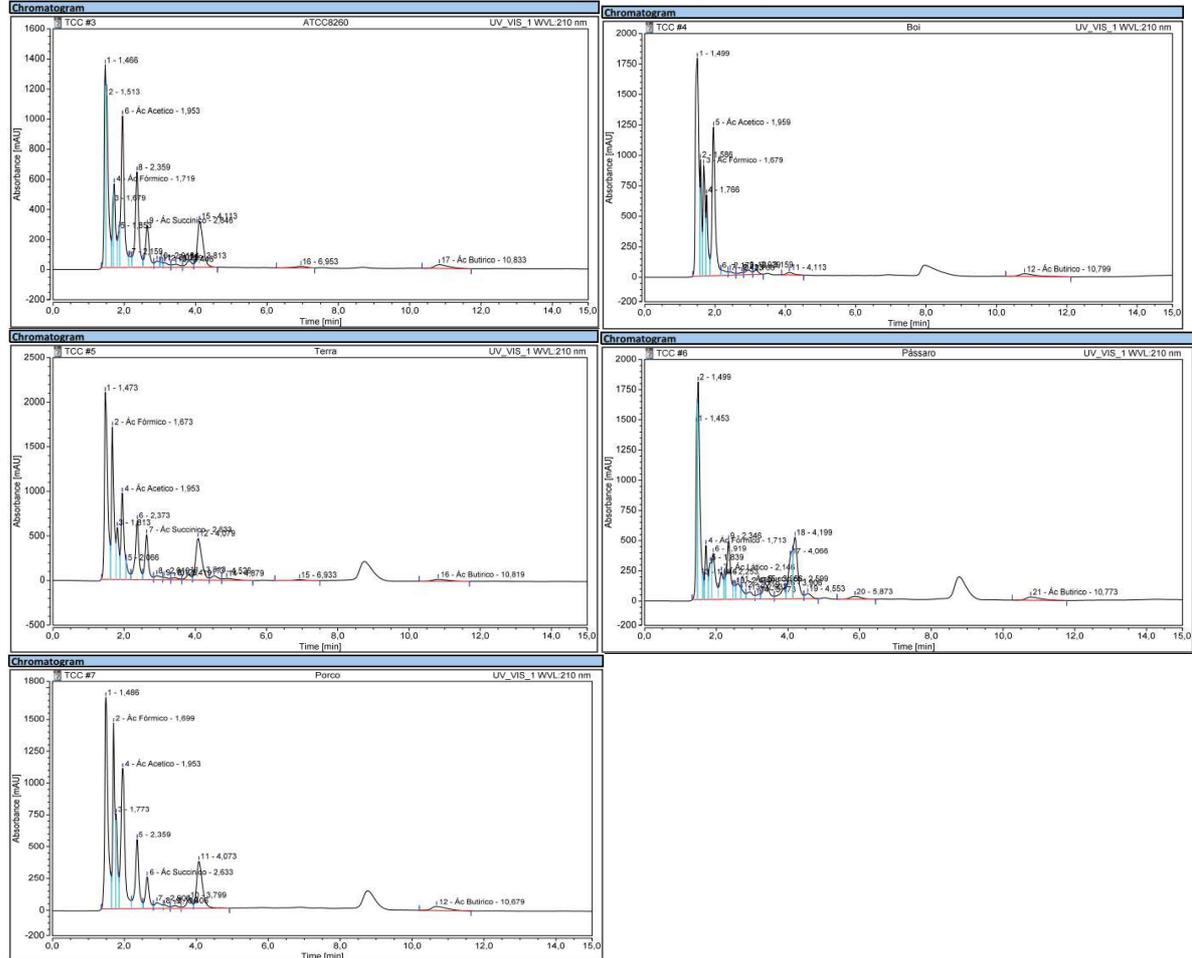
Os métodos de pré-tratamento são uma opção para tornar a biomassa mais suscetível à ação dos microorganismos. Porém, os métodos convencionais com ácidos, bases ou calor (Lynd et al., 2008) introduzem produtos químicos agressivos, o que pode ser prejudicial para o crescimento microbiano necessário para a fermentação.

Os resultados encontrados neste estudo foram extremamente satisfatórios, principalmente quando se leva em consideração o fato da não utilização de pré-tratamento. Em larga escala, essa produção seria mais viável em termos de tempo, custo e qualidade dos produtos obtidos.

Os cromatogramas dos AGVs produzidos pelos consórcios e cepas são apresentados na figura 6. Processou-se os cromatogramas por ajuste dos

parâmetros de integração otimizados (tangencial) e o mesmo software foi capaz de, a partir das curvas de calibração, quantificar os AGVs presentes nas amostras.

Figura 6 - Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos pela cepa pura e pelos consórcios microbianos A, B, C e D na 5ª geração



Fonte: autoria própria.

5 CONCLUSÃO

A produção de ácidos graxos voláteis por via biotecnológica a partir do bagaço da cana-de-açúcar se mostrou satisfatória. Todos os consórcios bioprospectados demonstraram eficiência na conversão de carboidratos em AGVs. Foi possível acompanhar o processo de fermentação anaeróbica e obter um processo de produção estável.

Os AGVs objetivados foram alcançados. Em comparação com outros estudos este trabalho obteve bom rendimento. Uma das vantagens em detrimento de outros trabalhos é a não utilização de pré-tratamento para o substrato, o que encareceria o processo e o tornaria mais demorado.

REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, ed. 4, p. 1020, 2008.

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. **Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice**. J. Chem. Technol. Biotechnol. n. 85, p. 732–743, 2010.

AKERBERG,C.; HOFVENDAHL K.; ZACCHI G.; HAHN-HAGERDAL B. **Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by Lactococcus lactis ssp Lactis ATCC 19435 in whole-wheat flour**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 (1998) 682–690.

ALFONSI, R. R.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1, p. 42-55.

AQUINO, S. F., CHERNICHARO, C. A. L. **Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle**. Engenharia Sanitária Ambiental. v. 10. n. 2, p 152-161. 2005.

AWAD, H. M.; DIAZ, R.; MALEK, R. A.; OTHMAN, N. Z.; AZIZ, R. A.; EL ENSHASY, H. A. **Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by Acetobacter aceti in Shake Flask and in Bioreactor Cultures**. E-Journal of Chemistry, v. 9, p. 2275-2286, 2012.

AZEVEDO, F. G. **Estudo das condições ambientais para produção de Biogás a partir de glicerol co-produto do Biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco – Campus de Recife – PE – Área de Concentração Engenharia Química, Recife, PE, 2010.

BALCH W. E.; WOLFE R. S. **New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere**. Appl Environ Microbiol. 1976; 32:781–791.

BALCH W. E.; FOX G. E.; MAGRUM L. J.; WOESE C. R.; WOLFE R. S. **Methanogens: reevaluation of a unique biological group**. Microbiol. 1976. Rev. 43:260-296.

BEARDSLEE, T.; PICATAGGIO, S. **Bio-based adipic acid from renewable oils**. *Lipid Technol.* n. 24, p. 223-225, 2012.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. **Biodegradation of cellulosic materials**: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, n. 2, p. 90-104, 1981.

BORGES, U.; FREITAG, H.; HURTIENNE, T.; NITSCH, M. **PROALCOOL**: economia política e avaliação sócio-econômica do programa brasileiro de biocombustível. Aracajú: UFS, 1988. 125 p.

BOUBAKER, F.; RIDHA, B. C. **Modelling of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste using anaerobic digestion model no.1**. *Bioresource Technology*. n. 99, p. 6565-6577, 2008.

BRAUN, R., DROSG, B., BOCHMANN, G., WEIF, S., KIRCHMAYR, R. **Recent developments in bio-energy recovery through fermentation**. 2010. 1 ed. v. 8, p. 20-25.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: CORTEZ, L. A. B. *Bioetanol de cana-de-açúcar. P&D para produtividade de sustentabilidade*. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. p. 365-380.

CAI, M.; CHUA, H.; ZHAO, Q.; SIN, N. S.; REN, J. **Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation**, *Bioresour. Technol.* n. 100, p. 1399–1405, 2009.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária-UFMG, 1997. 246 p. (Série Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 5).

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios**. v. 5, 2 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 380 p., 2007.

CHOI, J; CHANG, H. N.; HAN, J. **Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes**. *Biotechnol. Lett.* n 33, p. 705–714, 2011.

CHOPIN A. **Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in**

lactic acid bactéria. FEMS Microbiol. Rev. 12 (1993) 21–38.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária.** Brasília: Conab, 2013, v. 1, p. 1-154, ISSN 2318-3241.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dez. 2014.** Brasília: Conab, 2014. 20p.

CONAMA. **Indicadores da agropecuária.** Brasília, ano XXVI, n. 5, maio 2017, p. 01-116.

DAHIYA, S.; SARKAR, O.; SWAMY, S.; MOHAN, S. V. **Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen.** Bioresource Technology, 2015; 182: 103–113.

DALLATOMASINA, F.; ORTICA, R.; GIARDINO, P.; OPPICI, E. **Aspartame Synthesis**, US Patent 4.549.987 A, 29 out. 1985.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Composição química dos materiais lignocelulósicos.** In: Celulose e Papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. 2 ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988, v. 1, p. 45-106.

DATTA, R.; HENRY, M. **Lactic acid:** recent advances in products, processes and echnologies – a review. J. Chem. Technol. Biotechnol. v. 81, p. 1119–1129, 2006.

DATTA, R.; TSAI, S.P.; BONSIGNOR,P.; MOON, S.; FRANK J. **Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives.** FEMS Microbiol. Rev. 16 (1995) 221–231.

DELLA PINA, C.; FALLETTA, E.; ROSSI, M. **A green approach to chemical building blocks.** The case of 3-hydroxypropanoic acid. Green Chem. n. 13, p. 1624–1632, 2011.

DEUBLEIN, D; STEINHAUSER, A. **Biogas from Waste and Renewable Resources:** An Introduction. 2008. WILEY & Co.; Weinheim

DONGSHENG SHEN, JUN YIN, XIAOQIN YU, MEIZHEN WANG, YUYANG LONG, JIALI SHENTU, TING CHEN. **Acidogenic fermentation characteristics of different**

types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. *Bioresource Technology*, 2017; 227: 125–132.

ELCIO, R.B.; NEI, P.J. **Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1001–1011, 2011.

FASANELA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** Piracicaba, 2008. 80p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – USP – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2008. Piracicaba-SP.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERNANDES JÚNIOR, A. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.** São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, p 138-150.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; HAANDEI, A. V.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. **Fundamentos do Tratamento Anaeróbio.** In.: CAMPOS, J. R. *Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo.* 1. ed. Rio de Janeiro: RiMa Artes e Textos, 1999. p. 29-52.

GOKSUNGUR Y., GUVENC U. **Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* n. 74, p. 131–136, 1999.

GOLDBERG I.; ROKEM J. S.; PINES, O. **Organic acids: old metabolites, new themes.** *J Chem Technol Biotechnol.* n. 81, p. 1601–1611, 2006.

GOLDESTEN, I. S. **Organic Chemicals from Biomass.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1981. 320 p.

GOLUB, K. W.; SMITH, A. D.; HOLLISTER, E. B.; GENTRY, T. J.; HOLTZAPPLE, M. T. **Investigation of intermittent air exposure on four-stage and one-stage anaerobic semicontinuous mixed-acid fermentations.** *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 5066–5075, 2011.

GROOT, W. J.; BORÉN, T. **Life cycle assessment of the manufacture of lactide and biopolymers from sugarcane in Thailand.** *Int J Life Cycle Assess.* n. 15, p. 970-984, 2010.

HIGUCHI, T. **Biodegradation of lignina**: Biochemistry and potential applications. *Experientia*. v. 38, p. 567-576, 1982.

ICIDCA, Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. **Manual de los derivados de la caña de azúcar**. México: CEPLACEA, 1990. 447 p.
 JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. **Methanogenesis from acetate**: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Reviews*. n. 88, p. 181-198, 1992.

JANG, Y.S.; KIM, B.; SHIN, J.H.; CHOI, Y.J.; CHOI, S.; SONG, C.W.; LEE, J.; PARK, H.G.; LEE, S.Y. **Bio-based production of C2–C6 platform chemicals**. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2437–2459, 2012.

JOHN R.P., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A. **Simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation of protease treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli**. *Biotechnology Letters*. n. 28, p. 1823–1836, 2006.

JOHN R.P., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A. **Fermentative production of lactic acid from biomass**: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. n. 74, p. 524–34, 2007.

KAREL M., JAROSLAV V., VERA H., MOJMIR R. **Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate**. *Journal of Biotechnology*. n. 56, p. 25–31, 1997.

KIM, J. S.; KIM, H.; OH, K. K.; KIM, Y. S. **Acetic Acid Production Using Xylose and Corn Steep Liquor by thermoaceticum Strain**. *J. Ind. Eng. Chem*, v. 8, p. 519-523, 2002.

KIM, N.; PARK G. W.; KANG J.; KIM Y., CHANG H. N. **Volatile Fatty Acid Production from Lignocellulosic Biomass by Lime Pretreatment and Its Applications to Industrial Biotechnology**. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* . n. 18, p. 1163-1168, 2013.

KOSMIDER, A.; DROŹDŹYŃSKA, A.; BLASZKA, K.; LEJA, K.; CZACZYK. K. **Propionic Acid Production by Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii Using Crude Glycerol and Whey Lactose Industrial Wastes**. *Polish J. of Environ. Stud.* v. 19, p. 1249-1253, 2010.

KOTZAMANIDIS C, ROUKAS T, SKARACIS G. **Optimization of lactic acid production from beet molasses by Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130**. *World*

Journal of Microbiology and Biotechnology. n. 18, p. 441–448, 2002.

KUMAR, S.; BABU, B. V. **A Brief Review on Propionic Acid: A Renewal Energy Source.** Proceedings of National Conference on Environmental Conservation, p. 459-464, 2006.

LABIB, F.; FERGUSON, J. F.; MERIGH, M.; RICKER N. L. **Anaerobic butyrate degradation fluidized-bed reactor.** Effects of increased concentration of H₂ and acetate. Environ. Sci. Technol., n. 26, p. 369, 1992.

LANDELL, Marcos Guimarães de Andrade et al . **Residual biomass potential of commercial and pre-commercial sugarcane cultivars.** Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba , v. 70, n. 5, p. 299-304, Oct. 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162013000500003&lng=en&nrm=iso>. access on 22 June 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000500003>.

LEE, W. S.; CHUA, A. S. M.; YEOH, H. K.; NGOH, G. C. **A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids.** Chemical Engineering Journal, v. 235, p. 83-99, 2014.

LOBO, P. C.; JAGUARIBE E. F.; RODRIGUES, J. R. **Economics of alternative sugar cane milling options.** Applied Thermal Engineering. v. 27, n. 8-9, p. 1405-1413, 2007.

LORA, E. S.; ANDRADE, R. V. **Biomass as energy source in Brazil.** Renewable and Sustainable Energy Reviewes. v. 13, n. 4, p. 777-778, 2008.

LU, Y.; SLATER, F. R.; MOHD-ZAKI, Z.; PRATT, S.; BATSTONE, D. J. **Impact of operating history on mixed culture fermentation microbial ecology and product mixture.** Water Sci. Technol. 64 (3), 760–765, 2011.

MACEDO, I. C.; LEAL, M. R. L. V.; SILVA, J. E. A. R. **Balanço das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil.** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2004. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=11168105>>. Acesso em: 10 out. 2015.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relação das Unidades Produtoras cadastradas no Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia.** 2010. Disponível em: <http://agricultura.gov.br/arq_editor/file/1984_posição_04_2010.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2015.

MCCOY, M. **Big plans for succinic acid**. Chem Eng News. n. 87, p. 23-25, 2009.
 MERKLEIN, K.; FONG, S. S.; DENG, Y. **Production of butyric acid by a cellulolytic actinobacterium *Thermobifida fusca* on cellulose**. Biochemical Engineering Journal, v. 90, p. 239-244, 2014.

MERTENS, D.R. **Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows**. Journal of Dairy Science, v.80, p.1463, 1997.

MIRANDA, J. R. **História da cana-de-açúcar**. Campinas: Komedi, 2008. 167 p.
 MOTTE, J. C.; SAMBUSITI, C.; DUMAS, C.; BARAKAT, A. **Combination of dry dark fermentation and mechanical pretreatment for lignocellulosic deconstruction: An innovative strategy for biofuels and volatile fatty acids recovery**. Applied Energy, v. 147, p. 67-73, 2015.

MOTTE, J. C.; SAMBUSITI, C.; DUMAS, C.; BARAKAT, A. **Combination of dry dark fermentation and mechanical pretreatment for lignocellulosic deconstruction: An innovative strategy for biofuels and volatile fatty acids recovery**. Applied Energy, v. 147, p. 67-73, 2015.

MURALI N.; FERNANDEZ S.; AHRING B. K. **Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids**. Bioresource Technology, 2017; 227: 197–204.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **A Dimensão do Setor Sucroenergético - Mapeamento e Quantificação da Safra 2013/14**. 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, Fundance, FEA-RP/USP, 2014. Disponível em: <
http://www.brasilagro.com.br/imagens/pdf/Mapeamento_Quantificacao_Setor_Sucro_energetico_Safra_2013-14.pdf>. Acesso em: 02 out. 2015.

PAN X. J., ARATO C., GILKES N., GREGG D., MABEE W., PYE K., XIAO Z. Z., ZHANG X., SADDLER J. **Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping**: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel -grade ethanol and co-products, Biotechnology and Bioengineering. n. 90, p. 473–481, 2005.

PANDEY A., SOCCOL C.R., RODRIGUEZ-LEON J.A., NIGAM P. **Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech Publishers; 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Bioconversion of Biomass: A Case Study of Ligno-**

cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentation. New Delhi: Asiatech Publishers; 2004.

PARENTE, V. **O bom e o ruim do Plano Decenal 2007-2016**. Brasil Energia, n. 321, p. 81-82, ago. 2007.

PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: Nobel S.A., 1989.

PLASTICS TODAY. **Bioplastic demand spurs global growth in lactic acid production (2011)**. Disponível em: <<http://www.plasticstoday.com/articles/bioplastic-demand-spurs-globalgrowthlactic-acid-production>> Acesso em 23 out. 2015.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C.; CASAGRANDE, D. V. I.; YOSHIRO, B. **Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte**. Piracicaba: T.C.C. Ripoli, 2006, 216 p.
REBECCHI S.; PINELLI D.; BERTIN L.; ZAMA F.; FAVA F.; FRASCARI D. **Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins**. Chemical Engineering Journal, 2016; 306: 629–639.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico**. São Joaquim da Barra: Iara Coimbra, 2008. 25 p.

ROJAN P. J., NAMPOOTHIRI K. M., NAIR A. S., PANDEY A. **L(+)-lactic acid production using Lactobacillus casei in solid-state fermentation**. Biotechnol Lett. n. 27; p. 1685–1688, 2005.

SAHA B.C, NAKAMURA L.K. **Production of mannitol and lactic acid by fermentation with Lactobacillus intermedius NRRL B-3693**. Biotechnol Bioeng. n. 82, p. 865–871, 2003.

SAICHANA, N.; MATSUSHITA, K.; ADACHI, O.; FREBORT, I.; FREBORTOVA, J. **Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological application**. Biotechnology Advances, v. 33, p. 1260-1271, 2015.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. **Microbial production of organic acids: expanding the markets**. Trends Biotechnol. n. 26, p.100–108, 2008.

SHARMA N., WATI L., SINGH D. **Production of lactic acid during bioremediation of anaerobically digested molasses spent wash.** Indian Journal of Microbiology. n. 43, p. 119–121, 2003.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. **Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation.** Bioresource Technology, v. 145, p. 166-174, 2013.

SJOBLOM, M.; MATSAKAS, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; ROVA, U. **Production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum* (ATCC25755) using sweet sorghum stalks and beet molasses.** Industrial Crops and Products, v. 74, p. 535-544, 2015.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications.** 2. Ed. California, USA: Academic Press. 1992.

SONG H.; DING M. Z.; JIA X.Q.; MA Q.; YUAN Y.J. **Synthetic microbial consortia from systematic analysis to construction and applications.** Chem Soc Rev 2014;43: 6954e81.

STEIL, L. **Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos.** 2001. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

STERLING JR MC, LACEY RE, ENGLER CR, RICKE SC. **Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure.** Biores Technol 2001;77:9–18.

STRAATHOF, A. J. J. **Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells.** Chem Rev. n. 114, p. 1871–1908, 2014.

STRATFORD, M.; EKLUND, T. **Organic Acids and Esters** in: Russel, N. J.; Gould, G. W. Food Preservatives. Bedford, UK, Springer, 2003. Cap. 4, pag. 48-76.

SZMRECSÁNYI, T.; MOREIRA, E. P. **O desenvolvimento da agroindústria canavieira no Brasil desde a Segunda Guerra Mundial.** Estudos Avançados, São Paulo, v. 5, n. 11, p. 57-79, 1991.

TEDSREE, K.; LI, T.; JONES, S.; CHAN, C. W. A.; YU, K. M. K.; Paul A. J. BAGOT, P. A. J.; MARQUIS, E. A.; SMITH, G. D. W.; TSANG, S. C. E. **Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature**

using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst, Nature Nanotechnology, n 6, p. 302-307, 2011.

TÍMÁR-BALÁZXY, A.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. 444 p.

UNICA, União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Cana-de-açúcar: produtos**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/pages/cana_produtos.asp>. Acesso em: 28 ago. 2015.

UNICA, União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Relatório final da safra 2013/2014 - Região Centro-Sul**. 2014. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=88>>. Acesso em: 02 set. 2015.

UYAR, B.; EROGLU, I.; YÜCEL, M.; GÜNDÜZ, U. **Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents**. Int. J. Hydrogen Energy, n. 34, p. 4517–4523, 2009.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: Epgraf. 1994, p. 208.
VEIGA, C. F. M.; VIEIRA, J. R.; MORGADO, I.F. **Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatório de pesquisa**. Rio de Janeiro, FAERJ; SEBRAE/RJ, 2006. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/institutos/ib/denf/diagnosticocanaRJ.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2015.

VAN SOEST, P.J. **Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages**. Journal of Animal Science, v. 26, p.119-128, 1967.

VENKATESH, K.V. **Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid**. Bioresource Technology. n. 62, p. 91–98, 1997.

VICKROY T. B. **Lactic acid**. In: Moo-Young. Comprehensive Biotechnology. Pub: DicToronto: Pergamon Press. p. 761–776, 1985.

XAVIER S., LONSANE B. K. **Sugarcane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid state fermentation system**. Applied Microbiology and Biotechnology. n. 41, p. 291–295, 1994.

YANG, S-T.; HUANG, H.; TAY, A.; QIN, W.; DE GUZMAN L.; SAN NICOLAS E. C.

Extractive fermentation for the production of carboxylic acids. In: Yang S-T, editor. *Bioprocessing for valueadded products from renewable resources*. Elsevier; 2007. p. 421–446.

YHUANG, Y. L.; WU, Z.; ZHANG, L.; CHEUNG, C. M.; YANG, S. **Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor.** *Bioresour. Technol.* n. 82, p. 51–59, 2002.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. **Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method.** *Water Science and Technology*, v. 52, n.1-2, p. 85-91, 2005.

ZEIKUS J. G.; JAIN M. K.; ELANKOVAN P. **Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products.** *Appl Microbiol Biotechnol* 51(5):545–552, 1999.

ZIGOVA, J.; STURDIK, E. **Advances in biotechnological production of butyric acid.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 24, p. 153-160, 2000.

ZHANG, C. H.; Yang, H.; Yang, F. X.; Ma, Y. J. **Current progress on butyric acid production by fermentation.** *Curr. Microbiol.*, v. 59, p. 656-663, 2009.

ZHANG Z. Y, JIN B., KELLY J. M. **Production of lactic acid and byproducts fromwaste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* n. 23, p 229–236, 2007.

ZHENG, P.; FANG, L.; XU, Y.; DONG, J.J.; NI, Y.; SUN, Z.H. **Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*.** *Bioresour. Technol.* 101, 7889–7894, 2010.