

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM BENTO GONÇALVES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA**

GABRIELA DENARDI BALZAN

**ESTUDO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE E SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS EM CULTIVO SUBMERSO COM *Aspergillus niger* ATCC 1004**

BENTO GONÇALVES

2022

GABRIELA DENARDI BALZAN

**ESTUDO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE E SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS EM CULTIVO SUBMERSO COM *Aspergillus niger* ATCC 1004**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado como requisito parcial de obtenção
do título de Engenheira de Bioprocessos e
Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio
Grande do Sul.

Orientadores: Prof.º Dr. Fábio Luís Maciel e
Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina¹

Coorientadora: Prof.ª Ma. Marlene Guevara dos
Santos

BENTO GONÇALVES

2022

¹ Ambos contribuíram igualmente para o desenvolvimento do trabalho

Catalogação de publicação na fonte (CIP)

B198e Balzan, Gabriela Denardi

Estudo do processo de hidrólise e sacarificação de resíduos agroindustriais em cultivo submerso com *Aspergillus niger* ATCC 1004/ Gabriela Denardi Balzan. – Bento Gonçalves, 2022.

82 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Maciel

Orientadora: Prof.^a Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Coorientadora: Prof.^a Ma. Marlene Guevara dos Santos

1. Celulases. 2. Lignina. 3. Uva. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). I. Maciel, Fábio Luís. II. Tramontina, Francine Fioravanso. III. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2022. IV. Título.

GABRIELA DENARDI BALZAN

**ESTUDO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE E SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS EM CULTIVO SUBMERSO COM *Aspergillus niger* ATCC 1004**

Monografia apresentada como requisito parcial de obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadores: Prof.º Dr. Fábio Luís Maciel e Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina
Coorientadora: Prof.ª Ma. Marlene Guevara dos Santos

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof.º Dr. Fábio Luís Maciel
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Profª Dra. Ana Carolina Tramontina
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Profª Dra. Ana Lucia Kern
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Profª Ma. Cristiane Cassales Pibernat
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Dedico este trabalho aos meus pais Maristela Denardi Balzan e Carlos Balzan. A vocês, todo meu amor do mundo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maristela e Carlos, pelos ensinamentos fundamentais da vida, pelo esforço empenhado ao longo do meu crescimento, garantindo que não faltasse nada, mesmo nos momentos difíceis. Também, ao meu irmão Gustavo, pelo incentivo, apoio e paciência durante toda minha construção acadêmica.

Ao meu namorado, William, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e me estimulando durante a graduação e o desenvolvimento deste trabalho. Pela paciência e compreensão em relação a minha ausência, nas noites passadas no laboratório para realização dos experimentos, nos finais de semana em que precisei escrever este trabalho e em todos os outros momentos.

Às amigas de longa data, Maria e Danton, que muito fizeram por mim nos anos de convívio e permaneceram presentes, mesmo distantes fisicamente, nos últimos anos.

Aos meus colegas de curso e amigos pelo convívio e troca de experiências que me foram permitidas. Em especial, à Victória, por todas as oportunidades de trabalharmos juntas. Pelo Diretório Acadêmico, por todos os projetos, exposições, semanas acadêmicas, fóruns e SIEPEX que realizamos e contribuíram muito para meu desenvolvimento.

À Natália e Évelyn por toda a disponibilidade e dedicação na execução de trabalhos e projetos. Ao Lucas pelo convívio ao final do curso, pelas caronas compartilhadas e pelo extremo auxílio durante meu trabalho na Rinaldi S/A Indústria de Pneumáticos. A todos os colegas de trabalho e amigos da Rinaldi, pelas oportunidades, convívio e ensinamentos.

À Professora Dra. Francine Fioravanso Tramontina por estar presente sempre que necessário. Agradeço as estratégias para garantir os experimentos no laboratório, os conselhos, o convívio, a ajuda e as aulas remotas dadas dentro da unidade em Bento Gonçalves, para que eu pudesse finalizar os protocolos. Agradeço a oportunidade de trabalho em conjunto e por tudo que fez por mim e pelo meu trabalho.

À Professora Ma. Marlene Guevara dos Santos, pela disponibilidade e ajuda com os experimentos iniciais. Ao Professor Dr. Fábio Luis Maciel, pela orientação desde trabalho, mesmo nos momentos delicados que tem passado.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho e com meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

RESUMO

As indústrias de processamento de frutas geram altas quantidades de resíduos sólidos. A composição desses subprodutos se destaca pela riqueza em carboidratos, característica interessante para aproveitamento no setor bioenergético e valorização como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. A recalcitrância vegetal e a baixa disponibilidade de açúcares constituem obstáculos para a viabilidade do processo, demandando etapas de pré-tratamento e hidrólise, para enriquecimento da biomassa e obtenção de maior rendimento em etanol. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a aplicação de pré-tratamento alcalino em bagaço de maçã e uva e sua influência na deslignificação dos resíduos, na hidrólise enzimática e na sacarificação por celulases de *Aspergillus niger* ATCC 1004, em fermentação submersa. Após a caracterização físico-química dos bagaços, o pré-tratamento foi testado nas biomassas quanto à concentração de NaOH (2,5 e 5% m/v), em proporção 1:10, durante 30 minutos, em autoclave, a 121°C. Os licores obtidos foram, ainda, submetidos à precipitação ácida para recuperação da lignina como produto de valor agregado. Foram abordadas duas condições de cultivo: os bagaços tratados (0,5%), dispersos em meio mínimo (7 g/L de KH₂PO₄, 2 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 1 g/L de NH₄SO₄ e 0,6 g/L extrato de levedura), foram testados na presença (5% v/v) e na ausência de licor. Ao longo da fermentação, houve mensuração da concentração de açúcares redutores, atividade de celulases (CMCases) e dosagem de proteínas. Os resultados demonstraram que o processo de deslignificação dos bagaços induziu picos mais elevados de atividade enzimática (8,27 UI/mL para maçã e 8,69 UI/mL para uva), quando se compara à performance com os mesmos bagaços *in natura* (6,08 UI/mL para maçã e 7,86 UI/mL para uva). A adição de licor do pré-tratamento promoveu redução do tempo para um primeiro pico de atividade de CMCases, o qual ocorreu dentro das primeiras 72 horas para ambas biomassas, ao contrário do cultivo com sólidos dispersos, que demonstrou elevada indução da atividade somente a partir das 144 horas de fermentação. O enriquecimento com licor também permitiu maior rendimento no processo de sacarificação, alcançando 7,40 mg/L e 8,70 mg/L de açúcares redutores para maçã e uva, respectivamente. Dessa forma, o pré-tratamento alcalino para deslignificação de ambos os bagaços favoreceu a indução enzimática, reduzindo o tempo de cultivo e aumentando a eficiência dos processos de hidrólise e sacarificação.

Palavras-chaves: Bagaço. Maçã. Uva. Lignina. Hidrólise. Celulases.

ABSTRACT

Industries processing fruit juice generate large quantities of solid residues. These products composition stands out for the carbohydrate richness, an interesting characteristic to be exploited by the bioenergy sector, valued as a raw material for second-generation ethanol production. Plant recalcitrance and low sugar availability are two obstacles for the process viability, demanding pretreatment and hydrolysis steps for biomass enrichment and thus, larger ethanol yield. Therefore, the main goal of this project was to investigate the application of alkaline pretreatment in apple and grape bagasse and the influence it exerts on residues delignification, enzymatic hydrolysis and saccharification by cellulases produced by *Aspergillus niger* ATCC 1004 in submerged fermentation. After physical-chemical characterization of the bagasses, pretreatment was tested on the biomasses with varying NaOH concentration (2,5 and 5% v/v), proportionally 1:10, during 30 minutes, on an autoclave at 121°C. The obtained liquors were additionally submitted to acidic precipitation for lignin recovery as an added-value product. Two cultivation conditions were studied: treated bagasses (0,5%), dispersed in 100 mL of minimal medium (7g/L of KH₂PO₄, 2 g/L of K₂HPO₄, 0,5 g/L of MgSO₄.7H₂O, 1 g/L of NH₄SO₄ and 0,6 g/L of yeast extract) were tested in the presence (5% v/v) and absence of the liquor. During fermentation, reducing sugars concentration was evaluated, as well as cellulases activity (CMCase) and protein dosage. Results demonstrate that the delignification process of the bagasses induced elevated peaks of enzymatic activity (8,27 UI/mL for the apple-derived e 8,69 UI/mL for grape-derived) when compared to the same performance in natural bagasses (6,08 UI/mL for apple-derived and 7,86 UI/mL for grape-derived). The addition of pre-treatment liquor promoted time reduction for the first CMCase activity peak, which occurred within the first 72 hours for both biomasses, in contrast to the cultivation with dispersed solids, which demonstrated elevated activity induction from 144 hours of fermentation on. Liquor enrichment also allowed a larger yield in the saccharification process, reaching 7,40 mg/L and 8,70 mg/L of glucose for apple and grape, respectively. Therefore, alkaline pretreatment to both bagasses delignification favored enzymatic induction, decreasing cultivation time and increasing hydrolysis and saccharification efficiency.

Keywords: Bagasse. Apple. Grape. Lignin. Hydrolysis. Cellulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo Produtivo do Etanol de Segunda Geração	19
Figura 2 - Composição da parede celular vegetal.....	22
Figura 3 – Representação estrutural da celulose	24
Figura 4 - Representação estrutural de xilanas e glicomananas	25
Figura 5 - Representação estrutural da lignina	26
Figura 6 - Efeito do Pré-Tratamento na estrutura dos tecidos vegetais	27
Figura 7 - Refratômetro Analógico utilizado para medida do °Brix dos licores.....	39
Figura 8 - Bagaço de maçã.....	44
Figura 9 - Bagaço de uva.....	45
Figura 10 - Sólidos e soluções de NaOH anteriormente ao pré-tratamento em autoclave	49
Figura 11 - Sólidos e licor exatamente após o pré-tratamento em autoclave.....	49
Figura 12 - Aspectos morfológicos de BMT-2,5% e BMT-5%	50
Figura 13 - Aspectos morfológicos de BMT-2,5% seco.....	51
Figura 14 - Aspectos morfológicos de BUT-2,5% seco	51
Figura 15 - Licor negro filtrado em coador simples de pano	52
Figura 16 - Aspectos morfológicos de <i>A. niger</i> cultivado em sólidos e licores derivados dos bagaços de maçã e uva pré-tratados.....	55
Figura 17 - Aspectos morfológicos de <i>A. niger</i> cultivado em bagaço de maçã e uva <i>in natura</i>	56
Figura 18 - Aspectos morfológicos de <i>A. niger</i> cultivado em bagaço de maçã e uva pré-tratados	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentração de AR nos licores obtidos a partir do pré-tratamento alcalino	54
Gráfico 2 - Atividade de CMC _{Case} em meio contendo sólidos (BMT) e licores (LM) derivados do bagaço de maçã.....	58
Gráfico 3 - Perfil de atividade de CMC _{Case} e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de maçã pré-tratado (BMT) suplementado com licor (LM)	60
Gráfico 4 - Atividade de CMC _{Case} em meio contendo sólidos (BUT) e licores (LU) derivados do bagaço de uva.....	62
Gráfico 5 - Perfil da atividade de CMC _{Case} e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de uva pré-tratado (BUT) suplementado com licor (LU)	63
Gráfico 6 - Atividade de CMC _{Case} em meio mínimo contendo sólidos (BMT) derivados do bagaço de maçã.....	65
Gráfico 7 - Atividade de CMC _{Case} em meio mínimo contendo sólidos (BUT) derivados do bagaço de uva	66
Gráfico 8 - Perfil de atividade de CMC _{Case} e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de maçã pré-tratado (BMT)	67
Gráfico 9 - Perfil de atividade de CMC _{Case} e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de uva pré-tratado (BUT).....	68
Gráfico 10 - Influência do pré-tratamento alcalino no perfil de atividade enzimática para BMT	69
Gráfico 11 - Influência do pré-tratamento alcalino no perfil de atividade enzimática para BUT	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de materiais lignocelulósicos	23
Tabela 2 - Condições utilizadas para o pré-tratamento alcalino.....	38
Tabela 3 - Composição físico-química dos bagaços de uva e maçã.....	46
Tabela 4 - Sólidos Solúveis Totais antes e após a Precipitação Ácida	53
Tabela 6 - Atividade específica de celulases induzidas por sólidos enriquecidos com licor	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7 - Atividade específica de celulases induzidas por sólidos tratados	72
Tabela 8 - Estimativa da produção total de CMCases a partir dos bagaços de maçã e uva.....	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2.2	RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DERIVADOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA.....	20
2.3	COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL	21
2.3.1	Celulose	23
2.3.2	Hemicelulose	24
2.3.3	Lignina	25
2.4	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	26
2.4.1	Métodos Físicos.....	28
2.4.2	Métodos Físico-químicos	29
2.4.3	Métodos Químicos	29
2.4.4	Métodos Biológicos	30
2.5	HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	30
2.6	FERMENTAÇÃO	32
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	34
3.2	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	34
3.3	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	34
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	35
3.4.1	Diâmetro das partículas	35
3.4.2	Teor de Umidade	35
3.4.3	Teor de Cinzas	35

3.4.4	Teor de Extrativos	36
3.4.5	Teor de Lignina	36
3.4.6	Teores de Holo e Alfacelulose.....	37
3.5	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA.....	38
3.6	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	40
3.6.1	Preparo do inóculo.....	41
3.6.2	Determinação de Atividade Enzimática.....	41
3.6.3	Dosagem de Proteínas.....	42
3.6.4	Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR)	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS BAGAÇOS DE MAÇÃ E UVA.....	44
4.2	PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO	48
4.3	CULTIVO E CRESCIMENTO SUBMERSO DE <i>Aspergillus niger</i>	55
4.4	PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>Aspergillus niger</i> CULTIVADO EM BAGAÇO DE MAÇÃ E UVA PRÉ-TRATADOS E SUPLEMENTADOS COM LICOR ...	58
4.5	PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>Aspergillus niger</i> CULTIVADO EM BAGAÇO DE MAÇÃ E UVA PRÉ-TRATADOS DISPERSOS EM MEIO MÍNIMO	64
4.6	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO NO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO SOBRE O PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>Aspergillus niger</i>	69
4.7	PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE CELULASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus niger</i>	71
4.8	ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO TOTAL DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	72
5	CONCLUSÕES	74
6	PERSPECTIVAS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e industriais, advindos da Revolução Industrial, contribuíram para construção do atual estilo de vida baseado em obter, usufruir e descartar. A industrialização, com fornecimento de alimentos cada vez mais processados, e a prevalência de fontes não-renováveis nas matrizes energéticas globais, são reflexos desse princípio. Como resultado, tem-se a problemática da elevada geração de resíduos de processos agroindustriais (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018), largamente expressivos no Brasil.

A economia brasileira tem grande dependência no agronegócio e, mais especificamente, na agricultura. Indústrias de processamento de frutas, como maçã e uva, estão incluídas em setores agrícolas promissores (CEPEA; CNA, 2021). No ano de 2019, mais de 690 mil toneladas de uvas adentraram vinícolas e indústrias de sucos e derivados (MELLO; MACHADO, 2020), enquanto que mais de 270 mil toneladas de maçã foram destinados ao processamento (KIST *et al.*, 2019). Tais números indicam a geração de mais de 200 milhões de quilos de ambos os resíduos, cuja destinação é inviabilizada por fatores inerentes à natureza dos compostos e pela sazonalidade da geração.

A elevada disponibilidade de carboidratos complexos destaca os resíduos agroindustriais. A exploração desses compostos está atrelada ao conceito de biorrefinaria, a partir do fornecimento de matéria-prima para a obtenção de produtos de interesse econômico, como o etanol de segunda geração (2G), alternativa aos combustíveis fósseis e produzido a partir do aproveitamento da composição da biomassa lignocelulósica (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

Uma série de etapas antecede a fermentação, no processo de produção do etanol 2G. A recalcitrância vegetal e a complexidade da parede celular vegetal inviabilizam uma fermentação direta, sendo necessária a aplicação de técnicas de pré-tratamento e hidrólise para a obtenção de rendimentos adequados em etanol (SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020). Métodos químicos de remoção da lignina, a partir da aplicação de soluções alcalinas, são comumente empregados na etapa de pré-tratamento, promovendo exposição da celulose e hemicelulose, cuja hidrólise ocorre por ação de enzimas (BAJPAI, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2019).

Um grande gargalo econômico da produção de etanol 2G é a hidrólise enzimática. O emprego de enzimas carbohidrases purificadas, produzidas por microrganismos, eleva os custos do processo, reduzindo a competitividade do produto, frente a outras fontes energéticas.

Alternativamente, a exploração do cultivo de microrganismos sobre os resíduos lignocelulósicos, induz a produção de carboidrases, acarretando a quebra dos carboidratos complexos e sacarificação da biomassa (GUIMARÃES, 2016; HEMANSI *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos produtores de celulases e hemicelulases, a espécie *Aspergillus niger* é a mais representativa em relação à produção industrial de enzimas. O reconhecimento como “*generally regarded as safe*” (GRAS), pela Agência Americana de Controle de Alimentos e Medicamentos (FDA), impulsionou o cultivo e, atualmente, essa espécie é explorada industrialmente para a produção industrial de celulases, α -amilases, desidrogenases, oxidases, pectinases, proteases, lipases, lacases, dentre outras (LIMA *et al.*, 2019; SCHUSTER *et al.*, 2002).

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito do pré-tratamento alcalino sobre a degradação da lignina e sacarificação de bagaço de maçã e uva para a liberação de açúcares fermentescíveis em cultivo submerso de *Aspergillus niger* ATCC 1004.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a eficiência de degradação e liberação de açúcares dos resíduos de uva e maçã a partir do emprego de pré-tratamento alcalino a quente;
- Estimar a recuperação da fração de lignina extraída dos bagaços de uva e maçã, por meio de precipitação ácida;
- Avaliar o potencial de crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 1004 em cultivo submerso de resíduos de maçã e uva pré-tratados alcalinamente a quente;
- Quantificar a liberação de açúcares redutores ao longo de 7 dias de cultivo submerso com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em bagaço de maçã e uva pré-tratados alcalinamente a quente;
- Determinar a atividade de enzimas celulases ao longo de 7 dias de cultivo submerso com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em bagaço de maçã e uva pré-tratados alcalinamente a quente;

- Verificar o potencial de sacarificação de bagaço de maçã e uva pré-tratados alcalinamente a quente a partir da atividade de enzimas celulases secretadas por *Aspergillus niger* ATCC 1004 ao longo de 7 dias de cultivo submerso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esta seção do trabalho aborda o potencial da utilização dos resíduos de processos agroindustriais como matéria-prima para obtenção de etanol de segunda geração, apontando impasses relativos à redução da complexidade da matriz lignocelulósica vegetal.

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os avanços tecnológicos atuais direcionam a sociedade para um quadro de insustentabilidade energética e ambiental. Mundialmente, e de forma histórica, os principais recursos energéticos utilizados envolveram fontes não renováveis de energia, determinantes para as mudanças climáticas e o aquecimento global (ARSHAD *et al.*, 2018; LOSEKANN; HALLACK, 2018). Paralelamente, a industrialização impulsionada pelo crescimento da demanda alimentar acarretou o fornecimento de alimentos cada vez mais processados, expandindo o número de indústrias de processamento e ao impreterível aumento da geração de resíduos de alimentos (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

O recente conceito de bioeconomia se caracteriza como um modelo de produção industrial altamente sustentável dos pontos de vista ambiental, social e econômico. Pautada na recuperação de fontes potenciais, para manutenção do equilíbrio ecológico natural e da prosperidade econômica, a bioeconomia exclui o simples uso de fontes não-renováveis e caminha em conjunto ao conceito de biorrefinaria, no qual há total aproveitamento da biomassa lignocelulósica, a partir de sua conversão em diversos produtos de valor agregado, incluindo biocombustíveis, produtos químicos alternativos e energia (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

O pilar sustentável atrelado aos biocombustíveis faz seu uso bastante atrativo atualmente. Dentre a vasta gama de benefícios advindos desses combustíveis, estão a biodegradabilidade, a renovabilidade e a baixa geração de poluentes, implicando na redução substancial da emissão de gases de efeito estufa (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, são fontes energéticas sintetizadas a partir de biomassa, cuja abundância em constituintes como carboidratos e lipídeos a torna uma das únicas fontes viáveis para a produção de combustíveis, em comparação aos recursos fósseis (ABO *et al.*, 2019; RODRIGUES, 2011).

Os principais biocombustíveis sintetizados e já consolidados mundialmente são bioetanol, biodiesel e biogás (OH *et al.*, 2018). O bioetanol, especialmente, pode ser obtido a partir da fermentação de carboidratos presentes em biomassas vegetais, como a cana-de-açúcar, no Brasil (ARSHAD *et al.*, 2018). De forma histórica, o etanol foi e ainda é altamente produzido e aceito no mercado brasileiro (DA SILVA *et al.*, 2017).

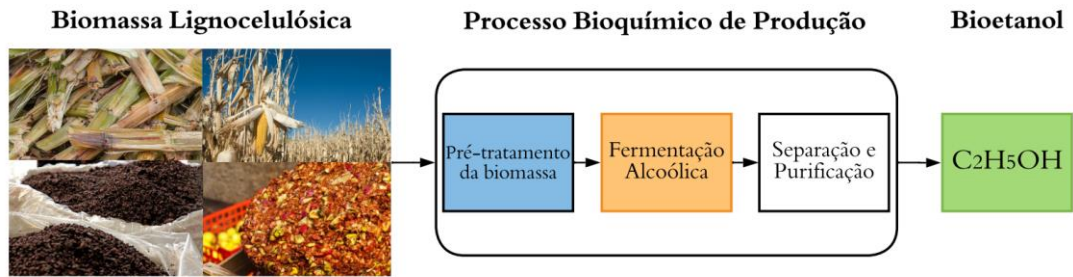
O etanol ou álcool etílico, de fórmula molecular C_2H_5OH , é um composto líquido, incolor, volátil, cujo odor é semelhante ao éter. A principal via utilizada para produção de etanol é a bioquímica, na qual leveduras, em geral *Saccharomyces cerevisiae*, são empregadas para fermentação de glicose em etanol. Diferentes biomassas são empregadas na rota de obtenção desse combustível e classificam-no como etanol de primeira geração (E1G), quando derivado de fontes ricas em açúcares, como a cana-de-açúcar, ou etanol de segunda geração (E2G), quando obtido a partir de resíduos lignocelulósicos (FGV, 2017; MELO, 2018).

A cana-de-açúcar é a principal fonte de açúcares para a obtenção de E1G no Brasil. O caldo extraído da cana, com aproximadamente 15 a 20% de sacarose, é metabolizado por leveduras e convertido em etanol (MELO, N. R., 2020). A beterraba, o milho e a mandioca também são matérias-primas empregadas para a produção de etanol de primeira geração em outras regiões do planeta (CROSATTI, 2017; MELO, 2018; ZHANG *et al.*, 2016).

Os biocombustíveis de segunda geração também participam da matriz energética brasileira. O bagaço e a palha da cana, resultantes do setor sucroenergético, são classificados como biomassa lignocelulósica e valorizados quando destinados à produção de E2G, ou etanol celulósico. O processo de obtenção desse produto se mostra de maior complexidade, devido à baixa disponibilidade de substrato para a fermentação presente na biomassa, característica que requer indução de alterações na estrutura vegetal para seu aproveitamento (MELO, 2020; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração pode ocorrer a partir de duas vias distintas: uma termoquímica e outra bioquímica. A técnica bioquímica (Figura 1), conhecida por bioconversão, compreende etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação (SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

Figura 1 - Processo Produtivo do Etanol de Segunda Geração



Fonte: Modificada de Abo *et al* (2019).

O processo ilustrado na Figura 1, inicialmente, é conduzido a fim de reduzir a complexidade do material vegetal, expondo carboidratos de interesse. Em seguida, ocorre a hidrólise, na qual ácidos ou complexos enzimáticos são aplicados para a liberação de açúcares fermentescíveis, substratos da fermentação alcoólica (SINGH; NANDA; BERRUTI, 2020). A condução de tais etapas reduz a competitividade do produto frente ao etanol 1G, o qual apresenta maior viabilidade econômica.

Por outro lado, a obtenção de etanol de primeira geração implica o uso de biomassas que concorrem com a alimentação humana e animal. Considerando as limitações para futuras expansões de terras agricultáveis, essa rota ameaça a segurança alimentar e impulsiona o estabelecimento de políticas governamentais como a Diretiva da Energia Renovável, na Europa (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016), e a Política Nacional de Biocombustíveis, no Brasil (BRASIL, 2017), voltadas ao estímulo da síntese e inserção de biocombustíveis avançados e novos biocombustíveis ao mercado nacional e internacional.

A utilização de resíduos agroindustriais como forma de obtenção de novos biocombustíveis integra, além de tudo, ações bioeconômicas. A riqueza em carboidratos, o baixo valor de aquisição e a alta disponibilidade de bagaços agroindustriais, no Brasil, são características capazes de reduzir o custo de produção do etanol celulósico (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018; IZMIRLIOGLU; DEMIRCI, 2016), além de complementar a oferta de biocombustíveis avançados no país, somando à produção do etanol 2G de bagaço ou palha de cana.

2.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DERIVADOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA

A fruticultura é um forte segmento do setor primário agrícola brasileiro. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, somando mais de 40 milhões de toneladas de frutas produzidas em 2019 (KIST *et al.*, 2021) e, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), perde somente para China e Índia, que contabilizaram, no mesmo período, mais de 240 e 100 milhões de toneladas de frutos colhidos, respectivamente.

Conforme dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/USP) em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), em 2021, a uva estava entre as culturas do setor primário com aumento esperado. Na comparação entre os primeiros seis meses de 2020 e 2021, o setor vitícola esperou um aumento de produção de mais de 19%, refletindo em elevação do faturamento próxima a 5% para o setor (CEPEA; CNA, 2021).

A produção total de uvas no Brasil a mantém como a quarta fruta mais produzida no país. Em 2021, foram colhidas mais de 1,6 milhão de toneladas da fruta, das quais mais de 60% foram cultivadas na Região Sul e cerca de 875 mil toneladas obtidas unicamente de vinhedos localizados no estado do Rio Grande do Sul (KIST *et al.*, 2021). No ano de 2019, aproximadamente 50% do total colhido foi destinado ao processamento e obtenção de derivados da uva, correspondente a mais de 690 mil toneladas de frutos (MELLO; MACHADO, 2020).

Um pouco atrás no ranking de frutas mais produzidas no Brasil está a maçã. Ocupando a oitava posição, com projeção de 1,1 milhão de toneladas de maçãs produzidas na safra 2021 (KIST *et al.*, 2021), a maçã se mantém como a terceira fruta mais comercializada nas Centrais de Abastecimento (CEASAs) do país (IBGE, 2019; KIST *et al.*, 2019). Entretanto, os números não se restringem somente ao mercado interno, já que em 2020 mais de 80 mil toneladas de maçãs e sucos de maçãs foram exportados, ultrapassando a marca de US\$ 40 milhões (KIST *et al.*, 2021).

A elaboração de vinhos, sidras, sucos e derivados de uva e maçã implica a geração de resíduos agroindustriais. O grupo de subprodutos obtidos a partir do esmagamento da uva corresponde a aproximadamente 20 a 25% da matéria-prima inicial e engloba engaço, cascas, polpa residual e sementes (MELLO; SILVA, 2014). Considerando a quantidade de frutos que

ingressaram em vinícolas e indústrias de suco, no ano de 2019, é possível estimar que tal safra resultou na geração de, pelo menos, 140 milhões de quilos de resíduos de uva.

Para a maçã, além das cascas, polpa residual e sementes, há também a presença do núcleo e da haste. Nesse caso, de 25 a 35% da fruta se torna resíduo, conforme o fluxo de obtenção do suco e o número de prensagens no qual as frutas são submetidas (PROZ, 2017). Tendo em vista que uma parcela de 20 a 25% da produção total de maçãs é destinada para obtenção de suco (KIST *et al.*, 2019), pode-se estimar a geração de mais de 90 milhões de quilos de resíduos de maçã.

A alta quantidade de subprodutos gerados pelas agroindústrias torna-se uma problemática ambiental constante. A sazonalidade da geração desses resíduos eleva os custos com gestão ambiental, dificultando a correta destinação por parte das fontes geradoras. Como forma de reutilização, ambos os bagaços de uva e maçã são empregados como fertilizantes, adubo orgânico, utilizados durante o processo de compostagem, para alimentação animal ou ainda são destinados a aterros sanitários.

A composição desses resíduos configura diversos obstáculos para tais aplicações. Características como baixo pH e presença de sementes inviabilizam sua utilização diretamente como adubo orgânico e fertilizante (CZAMANSKI, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2020). Como suplementação animal, ambos os resíduos apresentam baixa digestibilidade e baixa eficiência alimentar, levando a complicações gastrointestinais em ruminantes e diminuição da taxa de crescimento (CZAMANSKI, 2013), anomalias em terneiros (MATIELLO; WICPOLT; GAVA, 2016), redução da capacidade de retenção de água e elevação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) em porcos (FANG *et al.*, 2016). Ainda, a destinação para aterros sanitários apresenta alto custo e promove riscos ambientais graves (PROZ, 2017).

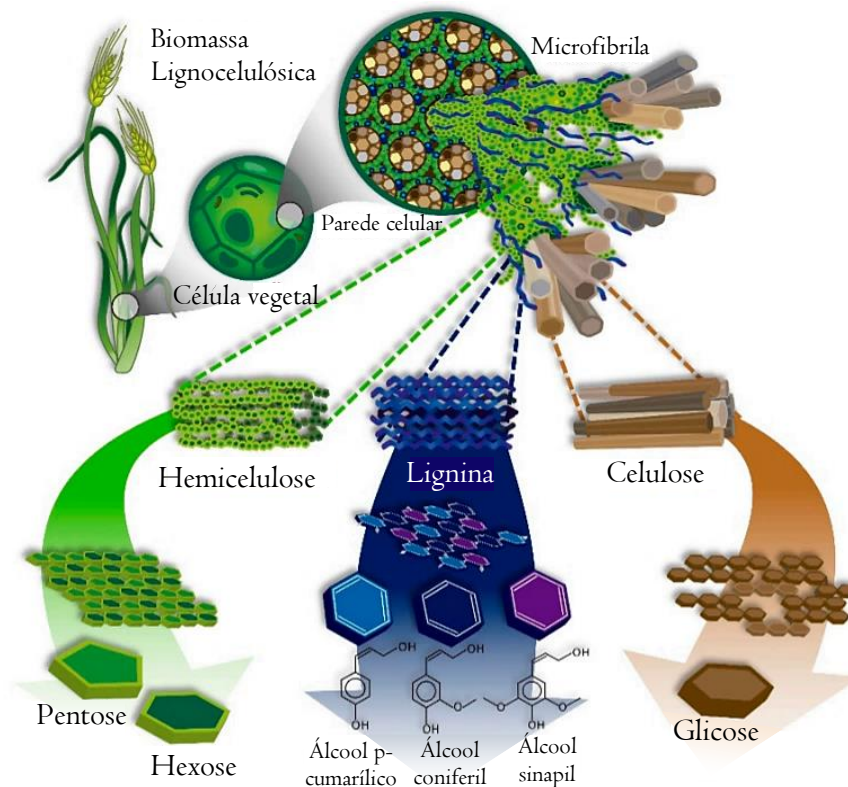
A abundância de tais resíduos no Brasil evidencia a disponibilidade de biomassa com potencial para a produção de etanol celulósico. O principal desafio atrelado ao processo reside na alta recalcitrância da parede celular vegetal, característica que dificulta a hidrólise dos complexos e heterogêneos carboidratos presentes nos resíduos (DA SILVA *et al.*, 2017).

2.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono renovável mais abundante no mundo (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Embora pouco explorada, essa matéria-prima é

caracterizada pela riqueza em carboidratos, sendo composta por aproximadamente 75% de polissacarídeos, sobretudo celulose e hemicelulose (Figura 2), as principais fontes de monossacarídeos para a produção de biocombustíveis (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a).

Figura 2 - Composição da parede celular vegetal



Fonte: Adaptada de Hernández-Beltrán, *et al* (2019).

O grande gargalo para o processamento da biomassa deriva da recalcitrância vegetal. Essa característica é derivada da interligação de variados polissacarídeos, que se unem para formação de uma complexa e rígida matriz constituinte da estrutura da parede celular vegetal. Dessa forma, a recalcitrância vegetal se refere ao conjunto de propriedades que atuam como mecanismo de proteção dos tecidos a ataques físicos e químicos, potencialmente promovido por enzimas, microrganismos e animais (DA SILVA *et al.*, 2017; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a).

Nessa matriz, moléculas de hemicelulose e lignina são arranjadas tridimensionalmente para compor uma barreira física altamente resistente, cuja função é impedir o acesso à celulose. De forma geral, a composição da biomassa compreende 40 a 50% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina (DA SILVA *et al.*, 2017; MAENPUEN *et al.*, 2017).

Entretanto, espécies vegetais apresentam distinta composição e variada proporção entre as três principais constituintes (Tabela 1) (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a).

Tabela 1 - Composição de materiais lignocelulósicos

Material Vegetal	Composição (% matéria seca)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana-de-açúcar	46,1 ± 0,7	20,1 ± 0,9	20,3 ± 0,6	(NOSRATPOUR; KARIMI; SADEGHI, 2018)
Palha de arroz	37,8 ± 0,2	29,6 ± 0,7	14,8 ± 0,4	(MUSTAFA; POULSEN; SHENG, 2016)
Bagaço de uva	25,9	3,6	22,5	(ROMO SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2015)
Bagaço de maçã	36,6	11	19	(PATHANIA; SHARMA; HANDA, 2018)

Dessa forma, gramíneas possuem maiores conteúdos de hemicelulose, quando comparadas a biomassas lenhosas, que apresentam maiores frações de celulose e lignina (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a). A distribuição dessas moléculas é também dependente de fatores como a variedade utilizada, o estágio de crescimento, a idade da planta e outros parâmetros agrícolas (BAJPAI, 2016).

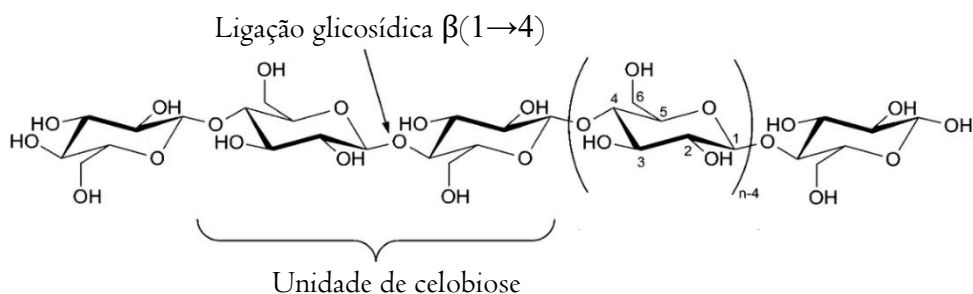
2.3.1 Celulose

A celulose constitui o maior componente da estrutura celular vegetal. Contando com uma disponibilidade anual próxima de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas, a celulose é o polímero mais abundante do planeta (ABO *et al.*, 2019). Do ponto de vista químico, a celulose é um homopolímero linear (Figura 3), formado pela repetição de unidades de celobiose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose, unidas por uma ligação glicosídica do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ (BAJPAI, 2016).

Dentro das células vegetais, pontes de hidrogênio e interações de van der Waals atuam na conexão das cadeias lineares de celulose para a constituição de estruturas denominadas microfibrilas. A elevada ordenação dessas estruturas confere força, rigidez e estabilidade aos

tecidos vegetais. A rede de ligação formada pelas microfibrilas alterna-se em regiões cristalinas, mais recalcitrantes à hidrólise enzimática, e regiões amorfas, as quais são menos ordenadas, possuem maior facilidade de absorção de água e suscetibilidade a ataques físicos e químicos (ABO *et al.*, 2019; PASIN *et al.*, 2020).

Figura 3 – Representação estrutural da celulose



Fonte: Adaptado de Eyley e Thielemans (2014).

2.3.2 Hemicelulose

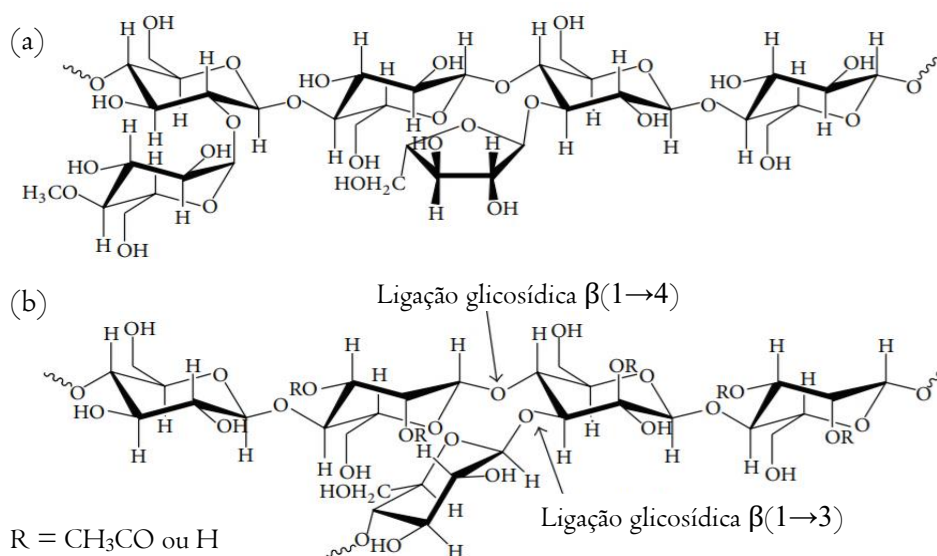
As microfibrilas de celulose são envoltas por moléculas de hemicelulose, o segundo maior polissacarídeo presente nas células vegetais. Diferentemente da celulose, a hemicelulose é composta por heteropolímeros ramificados de baixo peso molecular e apresenta xilanas, mananas, galactanas e galactomananas em sua composição (Figura 4). A estrutura hemicelulósica contém não somente ligações glicosídicas β -1,4 entre monômeros, mas também inclui ligações α -1,2; α -1,3; α -1,6; β -1,3 e β -1,6. Os principais monossacarídeos que a compõem são pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) (MAGALHÃES *et al.*, 2019). Outro principal constituinte é o grupo de ácidos urônicos, assim como os grupos acetil (DA SILVA *et al.*, 2017).

Fatores intrínsecos às ligações e aos próprios monômeros constituintes elevam a complexidade da hemicelulose, tornando-a essencial para a estrutura vegetal. O número e a diversidade de monômeros, ligações glicosídicas e o grau de polimerização diferem largamente entre espécies vegetais. Gimnospermas contém hemiceluloses compostas, principalmente, por

galactoglucomananas, enquanto angiospermas têm maior presença de glicomananas e gramíneas são majoritariamente compostas de arabinoxilanas (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a).

Embora haja certa resistência, as cadeias de hemicelulose além de menores, quando comparadas às de celulose, também são amorfas, o que facilita sua hidrólise (ABO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2017).

Figura 4 - Representação estrutural de xilanas e glicomananas



Fonte: Adaptada de Lee, Hamid e Zain (2014). (a) Estrutura de xilanas. (b) Estrutura de glicomananas.

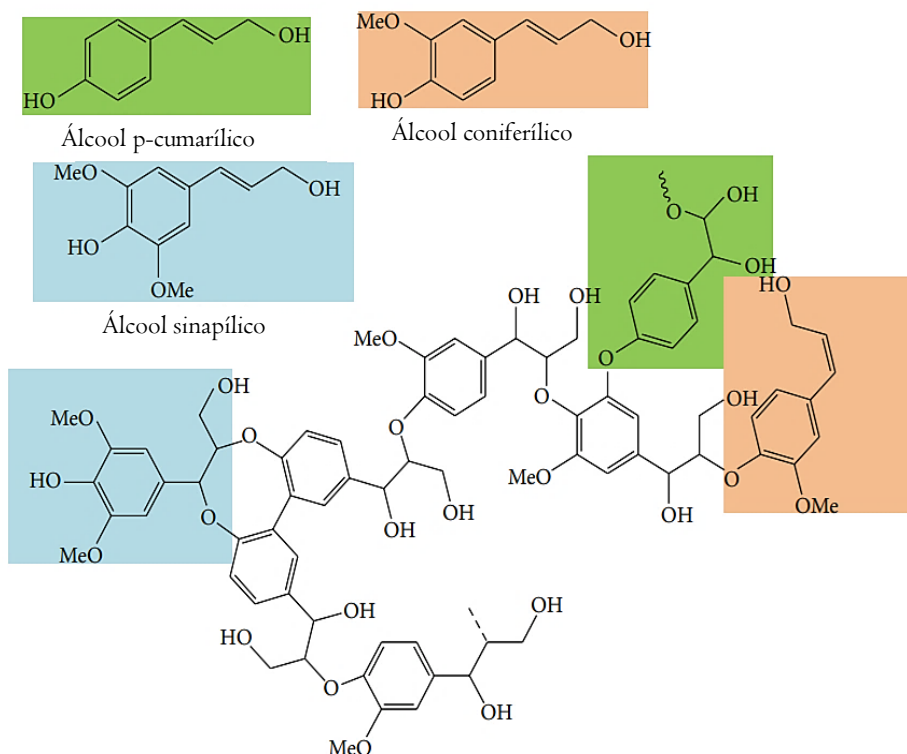
2.3.3 Lignina

O complexo celulose-hemicelulose se mantém imerso em uma matriz de lignina (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012b), o terceiro maior componente dos tecidos vegetais. A lignina é o único polímero aromático sintetizado biologicamente (ABO *et al.*, 2019). Ela está presente em todas as plantas vasculares e é constituída por uma rede amorfa de unidades de fenilpropano, as quais formam p-hidroxifenil, guaiacil e siringil, os blocos de construção da molécula, derivados da condensação de álcool p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 5), respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2017).

O papel estrutural da lignina está atrelado às ligações covalentes com ambos os polissacarídeos, celulose e hemicelulose. Dessa forma, as interações impedem a exposição da celulose à hidrólise, bem como conferem recalcitrância aos tecidos (RAVINDRAN; JAISWAL,

2016). Características de impermeabilidade, rigidez e resistência microbiana também são associadas à presença de lignina na parede celular (BAJPAI, 2016) e incidem diretamente sobre os processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica, dificultando o ataque microbiano e enzimático (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Figura 5 - Representação estrutural da lignina



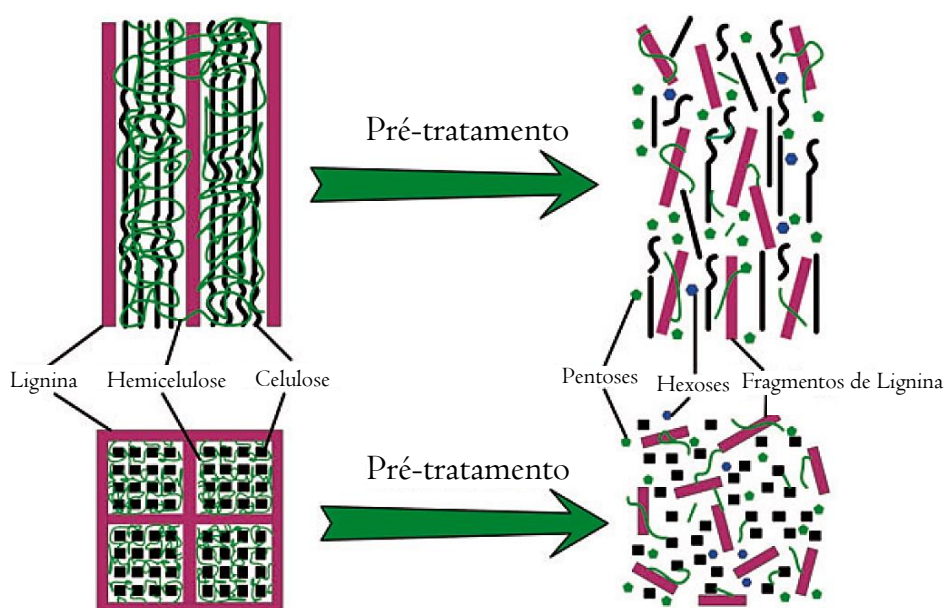
Fonte: Adaptada de Lee, Hamid e Zain (2014).

2.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A obtenção de etanol celulósico implica a superação da barreira recalcitrante presente na matriz vegetal. A ruptura das ligações entre o complexo lignocelulósico e a perda da complexidade do tecido vegetal são passos cruciais dos pontos de vista técnico e econômico do processo. A grande finalidade da etapa de pré-tratamento é aumentar a acessibilidade da celulose (Figura 6), principalmente a partir da remoção de hemicelulose e lignina, garantindo maior facilidade e otimização da eficácia do posterior ataque enzimático ou químico (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012b).

A estrutura dos polímeros que compõe a matriz lignocelulósica constitui um grande obstáculo para a atividade enzimática. O processo de hidrólise enzimática mostra-se complexo e ineficiente quando empregado, por si só, em resíduos lignocelulósicos, sendo imprescindível a aplicação de tratamentos prévios (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Características como cristalinidade e grau de polimerização da celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose dificultam o acesso das enzimas aos carboidratos presentes, exigindo a indução de mudanças na estrutura dos resíduos. (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Figura 6 - Efeito do Pré-Tratamento na estrutura dos tecidos vegetais



Fonte: Adaptada de Zhao, Zhang e Liu (2012b).

A escolha do método mais adequado deve levar em consideração os custos energéticos do processo, bem como a aplicabilidade em larga escala (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). De acordo com Ravindran e Jaiswal (2016), o melhor pré-tratamento dá origem a produtos finais que garantam o crescimento dos microrganismos desejados e não induz a formação de compostos inibidores das etapas posteriores.

A degradação de monossacarídeos liberados ao longo do pré-tratamento acarreta a formação de compostos com poder de inibição de atividades enzimática e microbiana. Distintos grupos de produtos são formados por derivação de glicose, xilose e lignina, os principais incluem ácidos alifáticos, como ácido fórmico, acético e levulínico; derivados de furano, como furfural e hidroximetil furfural, ambos os formados a partir de celulose e hemicelulose, além de

compostos fenólicos, produzidos unicamente a partir da lignina (BAJPAI, 2016; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

As possibilidades e taxas com que esses compostos são produzidos variam conforme o princípio da técnica e a composição de reagentes. Diversos métodos físicos, químicos, biológicos ou combinações deles são empregados como pré-tratamentos da biomassa (ABO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2017; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016) e são detalhados a seguir.

2.4.1 Métodos Físicos

Os métodos físicos são baseados na redução do tamanho das partículas do material lignocelulósico. De forma simples, é possível reduzir a cristalinidade da biomassa, bem como aumentar a área superficial e a porosidade das partículas (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019), sem que substâncias inibidoras sejam formadas. As técnicas físicas incluem moagem ou trituração, ultrassom, extrusão, dentre outros (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

A moagem é comumente realizada em moinhos de bolas ou facas até que as partículas atinjam tamanho próximo de 2 milímetros. Entretanto a técnica de micronização, que alcança uma faixa de tamanho de fragmentos na faixa dos micrômetros, é capaz de aumentar expressivamente o rendimento de glicose e xilose. Uma desvantagem desse tratamento é a alta demanda energética, o que resulta em elevação dos custos com o processo (ABO *et al.*, 2019).

Outro tratamento físico bastante interessante para a despolimerização da biomassa é o ultrassom. Esse método se baseia no fenômeno de cavitação induzido por ondas sonoras de alta frequência (> 20 kHz) que, quando propagadas em meios específicos, promovem a formação de bolhas de gás e vapor, as quais crescem conforme sua trajetória até colapsarem, culminando na cavitação. O rompimento da malha lignocelulósica ocorre por conta da elevada quantidade de energia liberada no colapso, que resulta em condições de aumento de pressão e temperatura (BUNDHOO; MOHEE, 2018; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

2.4.2 Métodos Físico-químicos

Metodologias físico-químicas também são empregadas para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. A partir da modulação de temperatura, pressão e teor de umidade do resíduo, técnicas de explosão de vapor, tratamento hidrotérmico, micro-ondas e expansão da fibra por amônia (AFEX) são utilizadas (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019).

O tratamento hidrotérmico (*Liquid Hot Water*, LHW) tem conquistado bastante atenção. Nesse caso, água em estado líquido é utilizada como reagente para dissolver a biomassa. O aquecimento do meio, a temperaturas entre 170 e 230°C, junto da aplicação de altas pressões, que geralmente ultrapassam 5 Mpa, levam o material à fervura. Tais condições permitem a degradação da hemicelulose, em taxas de recuperação de açúcares próximas a 90%, e remoção parcial da lignina (ABO *et al.*, 2019). A grande vantagem dessa metodologia é a redução da formação de compostos inibidores a partir do controle do pH, que deve ser mantido entre 4 e 7 (ABO *et al.*, 2019; BAJPAI, 2016).

2.4.3 Métodos Químicos

Os tratamentos químicos são altamente efetivos, promissores e aplicados em processos de fracionamento de substratos complexos. A remoção da fração lignínica do tecido ocorre de forma rápida e econômica quando ácidos, bases, solventes orgânicos ou líquidos iônicos são utilizados (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019). A técnica de hidrólise ácida se baseia na aplicação de ácidos fortes, como sulfúrico ou nítrico, em concentrações entre 0,5 e 3%, sob temperaturas entre 130 e 210°C para solubilizar a hemicelulose em monômeros, aumentando significativamente a acessibilidade da celulose para o ataque enzimático (ABO *et al.*, 2019).

O pré-tratamento alcalino, por sua vez, é também conhecido como deslignificação da biomassa. Isso porque utiliza hidróxidos de sódio, potássio ou cálcio, em condições amenas de temperatura e pressão, para clivar as ligações estruturais entre a lignina e as frações de carboidratos, rompendo a estrutura da lignina e reduzindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose (BAJPAI, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2019). A efetividade do tratamento alcalino é maior em biomassas com menor conteúdo de lignina, como resíduos agroindustriais, culturas herbáceas e madeira de coníferas (BAJPAI, 2016). Um impasse

relativo ao tratamento se deve à formação de compostos derivados de fenilpropano, descritos por sua alta capacidade de inibição da atividade enzimática (LADEIRA-ÁZAR *et al.*, 2019).

2.4.4 Métodos Biológicos

Em contrapartida aos pré-tratamentos químicos, as abordagens biológicas são vias mais ambientalmente corretas. De forma análoga às técnicas já descritas, enzimas ou microrganismos são aplicados para remoção das frações de lignina presentes em materiais vegetais. A dispensabilidade do controle de altas temperaturas e pressão, da utilização de compostos químicos e a insignificante formação de substâncias inibidoras, estão entre os maiores benefícios da abordagem biológica (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

O complexo de enzimas ligninolíticas engloba as lacases, fenoloxidasas que otimizam a capacidade fermentativa e o crescimento microbiano (PASIN *et al.*, 2020; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Fungos lignocelulíticos, pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota, produzem enzimas hidrolíticas e ligninolíticas, como peroxidases e lacases e são cultivados para reduzir a complexidade da biomassa (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019). Algumas espécies de fungos também são capazes de remover a lignina por vias não-enzimáticas (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Apesar dos benefícios dos bio-pré-tratamentos, algumas desvantagens impedem sua aplicação industrial. Embora as reações enzimáticas apresentem alta especificidade e elevada velocidade, o alto custo de aquisição das enzimas ainda configura desafios para essa tecnologia (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019). O uso de microrganismos, por sua vez, prolonga o tempo de reação, já que a atividade microbiana é lenta e o controle ainda possui diversas limitações (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

2.5 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Muito embora os tratamentos prévios possibilitem a liberação de açúcares fermentescíveis, a etapa de hidrólise é fundamental para o processo de obtenção de etanol 2G. A maior composição em glicose está presente na fração de celulose da biomassa, cuja

cristalinidade demanda a aplicação de técnicas específicas de ataque para o alcance de rendimentos adequados em monossacarídeos (ABO *et al.*, 2019).

Nesse cenário, duas rotas distintas de hidrólise são empregadas, hidrólise ácida ou enzimática. A primeira, semelhante ao pré-tratamento, se baseia na aplicação de ácidos fortes diluídos ou concentrados para romper as ligações glicosídicas presentes na molécula de celulose. Embora alcance faixas elevadas de rendimento em glicose, o método induz a formação de inibidores, como furfuraldeído (ABO *et al.*, 2019).

A hidrólise enzimática explora a capacidade de quebra da celulose por coquetéis enzimáticos (PASIN *et al.*, 2020). Uma vasta gama de enzimas são aplicáveis a biomassas de origens e composições distintas, porém a despolimerização das moléculas de celulose e hemicelulose é alcançada unicamente por meio da atividade de celulasas e hemicelulasas, respectivamente (HERNÁNDEZ-BELTRÁN *et al.*, 2019; PASIN *et al.*, 2020).

As celulasas são enzimas hidrolases, cuja função é romper ligações glicosídicas presentes nas microfibrilas de celulose. Produzidas por fungos e bactérias anaeróbias, na forma de celulosomas, as celulasas são classificadas em endo-, exo-glucanases e β -glicosidasas e operam sinergicamente em diferentes regiões da molécula de celulose para a sacarificação da biomassa. A total conversão da celulose em glicose é impossibilitada pela susceptibilidade de β -glicosidase e exoglucanase à inibição por seus produtos, principalmente em condições de altas concentrações de biomassa (PASIN *et al.*, 2020).

A aplicação industrial de coquetéis enzimáticos purificados ainda constitui um grande gargalo econômico para a produção de etanol 2G. Alternativamente, a exploração da maquinaria de microrganismos demonstra grande potencial para redução de custos com a etapa de hidrólise enzimática. Os fungos representam grupos de microrganismos altamente relevantes para a produção industrial de enzimas. Dentre os gêneros mais citados para despolimerização de celulose e hemicelulose, os mais utilizados em indústrias biotecnológicas são *Trichoderma* e *Aspergillus* (GUIMARÃES, 2016; HEMANSI *et al.*, 2019).

A espécie de *Aspergillus* mais representativa em relação à produção industrial de enzimas é *Aspergillus niger*. O nome do gênero “*Aspergillus*” é derivado de sua aparência durante a fase de reprodução assexuada, remetendo ao aspersor de água benta, denominado “*Aspergillum*”, utilizado por padres durante as cerimônias do Asperges (LIMA *et al.*, 2019).

A. niger é um ascomiceto filamentosos ubiqüitário, encontrado naturalmente em diversos ambientes aeróbicos, principalmente no solo e em tecidos vegetais em decomposição

(SCHUSTER *et al.*, 2002). Hipóteses sobre a resistência e competitividade dessa espécie em ambientes naturais relacionam a coloração escura presente nos seus esporos com certa proteção à radiação ultravioleta e à luz solar (LIMA *et al.*, 2019).

O emprego de *Aspergillus niger* para produção industrial de enzimas foi impulsionado a partir dos anos 1960. Nessa época, a Agência Americana de Controle de Alimentos e Medicamentos (FDA) reconheceu diversas de suas enzimas como “*generally regarded as safe*” (GRAS), assegurando seu uso em alimentos. Atualmente *A. niger* é cultivado para a produção industrial de celulasas, α -amilases, desidrogenases, oxidases, pectinases, proteases, lipases, lacases, dentre outras (LIMA *et al.*, 2019; SCHUSTER *et al.*, 2002).

Dois tecnologias distintas são empregadas para a produção de enzimas a partir de microrganismos: fermentação em estado sólido (SSF) ou fermentação submersa (SmF). A técnica SSF se aproxima das interações naturais, permitindo o acoplamento do microrganismo aos substratos sólidos. Esse método é largamente aplicado para a síntese de enzimas a partir de resíduos, já que apresenta baixos custos e eficiência no processo fermentativo. Contudo, o sistema industrial de SSF geralmente ocorre em biorreatores de bandeja, o que gera heterogeneidades no processo, derivadas das ineficientes trocas de calor e massa (HEMANSI *et al.*, 2019).

A metodologia SmF é caracterizada pelo excesso de água no meio reacional. Tal condição é bastante vantajosa do ponto de vista industrial, por permitir maior monitoramento e controle de temperatura, pH, níveis de aeração e crescimento do microrganismo. Entretanto a técnica SmF resulta em moderados rendimentos de enzimas, elevada geração de efluentes líquidos e custos de processo (HEMANSI *et al.*, 2019).

2.6 FERMENTAÇÃO

A sacarificação da biomassa culmina na síntese de etanol por leveduras ou bactérias específicas. A espécie de levedura mais comumente empregada industrialmente é *Saccharomyces cerevisiae*, devido à robustez e capacidade de fermentação de matérias-primas distintas, alcançando altos rendimentos de álcool (ABO *et al.*, 2019). *S. cerevisiae* catalisa eficientemente hexoses, principalmente glicose, porém falha na catálise de pentoses, como xilose e arabinose, derivadas da quebra da hemicelulose. Outras leveduras dos gêneros *Pichia*,

Candida e *Kluyveromyces* possuem capacidade de catálise de diferentes açúcares e demonstram potencial de emprego para produção de etanol (SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

Independente da natureza dos açúcares presentes, o rendimento máximo teórico de combustível se mantém. Conforme cálculos derivados da conversão de glicose em etanol, um grama de glicose produz 0,511 gramas de etanol, entretanto perdas envolvendo a manutenção e a produção de biomassa microbiana, além de fatores como concentração de substrato, requerimento de nutrientes, pH, temperatura, concentração de etanol e presença de inibidores, alteram a cinética da fermentação, contribuindo para redução do rendimento (ABO *et al.*, 2019; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

De forma a superar impasses relativos às interações entre produtos, enzimas e microrganismos, diferentes abordagens são aplicadas às etapas de sacarificação e fermentação. As tecnologias incluem Hidrólise e Fermentação em separado (SHF), Sacarificação e Fermentação simultâneas (SSF), Sacarificação e Co-Fermentação simultâneas (SSCF) e Bioprocesso Consolidado (CBP), as quais possuem particularidades (ABO *et al.*, 2019; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

O processo SHF é conduzido em batelada ou utilizando reatores independentes, permitindo a manutenção de condições ótimas para hidrólise enzimática e fermentação. O método SSF é o mais utilizado industrialmente para obtenção de etanol, devido à junção dos processos, a qual permite o consumo dos açúcares imediatamente após sua liberação, elevando o rendimento em etanol (ABO *et al.*, 2019; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

Por outro lado, os métodos SSCF e CBP exploram técnicas de engenharia genética. O primeiro utiliza apenas um reator para performance da hidrólise e da fermentação, mas nesse caso, tanto glicose como xiloses são catabolizadas para conversão em etanol, empregando linhagens modificadas. No processo CBP, ocorre a junção das etapas em um único processo, utilizando microrganismos construídos especialmente para esse fim ou a partir de um consórcio microbiano (ABO *et al.*, 2019; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

3 METODOLOGIA

Esta seção do trabalho descreve a metodologia utilizada para o desenvolvimento dos experimentos, abrangendo a caracterização da biomassa utilizada, o pré-tratamento aplicado, as estratégias de cultivo de *Aspergillus niger* ATCC 1004 e os ensaios de atividade enzimática, dosagem de açúcares redutores e proteínas.

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os laboratórios de Química e Microbiologia da Unidade em Bento Gonçalves da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul foram utilizados para a realização de todos os experimentos.

3.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos do processamento de uva e maçã foram cedidos por uma indústria familiar, localizada no interior da cidade de Garibaldi, Rio Grande do Sul. A empresa é certificada para produção orgânica de sucos de uva e maçã, vinagres, óleos e farinhas de cascas e sementes de uva. No caso dos sucos de uva, a variedade ‘Bordô’ é a única utilizada para sua produção, enquanto que para os sucos de maçã, uma mistura das variedades ‘Gala’ e ‘Fuji’ é submetida ao processamento. A fim de homogeneizar o tamanho das partículas em cada resíduo e aumentar a área superficial disponível para a ação de métodos de pré-tratamentos e hidrólise enzimática, os bagaços foram moídos em moinho de facas.

3.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

A linhagem de *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi obtida do Banco de Culturas da Fundação André Tosello, localizada em Campinas, São Paulo. A cultura foi mantida em Placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA), a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e repicada periodicamente.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

A fim de otimizar os procedimentos posteriores de pré-tratamento e hidrólise da biomassa, é imprescindível o conhecimento de suas características físico-químicas. As técnicas empregadas para caracterização dos resíduos utilizados se basearam nos padrões TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*).

3.4.1 Diâmetro das partículas

Após a moagem, os resíduos foram peneirados e a fração de sólidos com diâmetro menor de 700 µm foi utilizada para os experimentos seguintes.

3.4.2 Teor de Umidade

A estimativa do teor de umidade do material consiste na determinação de seu percentual de água. Amostras de 1 grama de cada resíduo foi submetida à secagem em estufa, com temperatura próxima de $105 \pm 2^\circ\text{C}$, até a obtenção de massa constante. O teor de umidade foi determinado pela razão entre a massa de água perdida e a massa inicial da amostra. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.4.3 Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas de resíduos vegetais se baseia na combustão do material para obtenção de sua fração mineral. Amostras com aproximadamente 5 gramas de cada resíduo foram submetidas à ignição em forno mufla a 600°C , com rampa de aquecimento igual a $9,6^\circ\text{C}/\text{min}$, durante 4 horas. O percentual de minerais foi calculado a partir da razão entre a massa calcinada resultante e a massa inicial da amostra. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.4.4 Teor de Extrativos

A análise do teor de extrativos dos tecidos é empregada para quantificar componentes que não participam da estrutura vegetal, mas que desempenham funções fisiológicas nas plantas. A determinação desses compostos foi realizada por extração Soxhlet, utilizando aproximadamente 15 gramas de cada resíduo e 150 mL de acetona industrial, durante seis horas com refluxo contínuo. A amostra resultante foi, posteriormente, seca em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. O cálculo do percentual de extrativos foi baseado na razão entre diferença de massa da amostra antes e depois da extração e o peso da amostra inicial. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

3.4.5 Teor de Lignina

A quantificação da fração lignínica dos resíduos é imprescindível para determinação e otimização do processo de pré-tratamento da biomassa, a fim de expor a celulose à hidrólise enzimática. O método direto de determinação do teor de lignina, também conhecido como lignina de Klason, consiste na dissolução dos carboidratos presentes na biomassa, a partir da aplicação de ácido sulfúrico diluído. Os sólidos resultantes, após secagem em estufa, correspondem à fração de lignina insolúvel do material. Uma pequena parte dessa fração, eventualmente, é solúvel em ácido e sua quantificação é realizada por meio da relação entre os resultados de absorvância nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm, conforme Equação 1:

$$CLS = \frac{(4,53 * A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (1)$$

em que CLS é a concentração de lignina insolúvel na amostra e A_{215} e A_{280} são os valores de absorvância em 215 e 280 nm, respectivamente. A partir do valor de CLS, obtém-se a massa de lignina solúvel em cada amostra, relacionando ao volume da amostra inicial. O teor de lignina insolúvel é obtido comparando a massa obtida com a massa inicial de amostra.

Para a digestão, 17 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) foi aplicado a 1 grama de biomassa seca e sem extrativos em um almofariz. O conjunto foi agitado, com auxílio do pistilo, durante 15 minutos e, em seguida, mantido em contato durante 24 horas. Posteriormente, 300 mL de

água destilada foram adicionados ao conjunto, a fim de diluir o ácido para 4% (m/m) e o conteúdo foi submetido a aquecimento e refluxo por quatro horas. Após resfriamento, o conteúdo foi filtrado sob vácuo e uma alíquota do filtrado ácido foi recolhida para a quantificação do conteúdo de lignina solúvel. Os sólidos resultantes foram secos em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por aproximadamente 18 horas e sua massa foi quantificada. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

O percentual de lignina insolúvel foi obtido pela razão entre a massa dos sólidos resultantes e a massa inicial da amostra. O teor de lignina solúvel foi determinado de acordo com a equação 1 e com as relações de massa e volume amostrais.

3.4.6 Teores de Holo e Alfacelulose

O conteúdo de hemicelulose em um material lignocelulósico pode ser quantificado por meio da avaliação do teor de holocelulose. Esse termo se refere ao conjunto global de carboidratos presentes em tecidos vegetais, incluindo celulose e hemicelulose. Para isolar os percentuais de cada carboidrato, analisa-se também o teor de α -celulose, que corresponde a fração não degradada da celulose, cuja molécula apresenta-se em maior tamanho e com maior número de resíduos de glicose.

Dentre as técnicas utilizadas para a mensuração de holocelulose, a principal delas é fundamentada na reação de oxidação por cloro em meio ácido. A partir do emprego de clorito de sódio e ácido acético a quente, ocorre oxidação da lignina, permitindo a recuperação da holocelulose. Dessa forma, 100 mL de hipoclorito de sódio 2,5% (m/m) e 1 mL de ácido acético glacial foram aplicados a 3 gramas de cada resíduo seco e sem extrativos. O conjunto foi tamponado e inserido em banho de óleo agitado, com temperatura igual a $70^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por três ou quatro horas. Em intervalos de 60 minutos, novas adições de 100 mL de hipoclorito de sódio e 1 mL de ácido acético glacial foram realizadas e a reação foi mantida até branqueamento total dos sólidos.

Em seguida, o conjunto foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e filtrado sob vácuo. O precipitado recolhido foi seco em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante. O percentual de holocelulose foi calculado a partir da razão entre a diferença de massa ao longo do processo e a massa inicial da amostra, considerando também, os teores de extrativos e umidade. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

A fração de α -celulose é determinada com base na porção de holocelulose que, em contato com solução de hidróxido de sódio, não se dissolve. Para a análise, 15 mL de uma solução de NaOH com concentração igual a 17,5% foram aplicados a um grama dos sólidos obtidos pela mensuração de holocelulose. Após dois minutos de contato e oito minutos de trituração do conjunto, 40 mL de água destilada foram transferidos para o conjunto e o conteúdo foi filtrado sob vácuo. O precipitado recolhido foi seco em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

O percentual de α -celulose foi calculado a partir da razão entre a diferença de massas ao longo do processo e a massa inicial da amostra de holocelulose. A correção do percentual foi realizada relacionando o valor encontrado de α -celulose com o teor de holocelulose corrigido e esse corresponde ao teor de celulose total da biomassa. O conteúdo de hemicelulose foi encontrado pela subtração do valor de α -celulose do total encontrado para holocelulose.

3.5 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

De forma a reduzir a recalcitrância da parede celular vegetal dos resíduos utilizados no presente trabalho e considerando a composição de celulose, hemicelulose e lignina, foi explorado o pré-tratamento alcalino. Soluções de concentrações iguais a 2,5 e 5% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) foram preparadas e incorporadas aos resíduos em proporção 1:10 em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Os conjuntos foram levados à autoclave e submetidos a temperatura de 121°C por 30 minutos. As condições experimentadas para cada tratamento estão detalhadas na Tabela 2. Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata.

Tabela 2 - Condições utilizadas para o pré-tratamento alcalino

Tratamento	Biomassa	Carga de sólidos (%)	Concentração de NaOH (%)	Tempo de residência (min)
1	Maçã	10	2,5	30
2	Maçã	10	5	30
3	Uva	10	2,5	30
4	Uva	10	5	30

Fonte: Autora (2022)

Tendo em vista que tratamentos alcalinos agem preferencialmente sobre a lignina, promovendo sua degradação e, conseqüente, liberação de compostos derivados, principalmente fenóis (GONZÁLEZ-BAUTISTA *et al.*, 2017; LADEIRA-ÁZAR *et al.*, 2019), a fração sólida obtida do tratamento alcalino foi separada do licor por filtração em coador simples de pano e submetida à lavagem com água deionizada, até que o pH do filtrado se encontrasse próximo ao pH da água utilizada. Em seguida, os sólidos foram secos em estufa a temperatura próxima de 90°C e moídos em almofariz com auxílio de pistilo.

Devido à degradação específica ocasionada pela natureza do pré-tratamento, o licor resultante contém alta concentração de lignina e compostos fenólicos. Para redução desses teores, utilizou-se o método de precipitação ácida, no qual a adição de ácidos fortes induz a protanação dos grupos fenólicos presentes na molécula de lignina. Tal mecanismo intensifica as forças de atração entre moléculas, levando à agregação e precipitação (JÚNIOR, 2020).

Dessa forma, o procedimento para precipitação ácida derivou de Fernandes, Mussatto e Roberto (2006), em que 14 mL dos licores foram tratados com volume de HCl 10 M suficiente para reduzir o pH a 3,0. Em seguida, foram homogeneizados, centrifugados a 4500 g por 10 minutos e mantidos a 4°C por 24 horas para precipitação da lignina que ainda se mantinha solúvel. Após isso, os licores foram novamente centrifugados a 4500 g por 20 minutos e filtrados em Funil de Buchner sob vácuo. Os filtrados resultantes foram mantidos a 4°C até sua diluição a meio mínimo para os ensaios de hidrólise enzimática.

Anteriormente e após a precipitação ácida da lignina, utilizou-se um refratômetro analógico (Figura 8) para medição do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) presente nos licores.

Figura 7 - Refratômetro Analógico utilizado para medida do °Brix dos licores



Fonte: ASA, (2022)

A medida de °Brix é definida como o conteúdo de sólidos solúveis totais (SST, em gramas) presente em 100 gramas de solução, incluindo frações de açúcares. O instrumento mensura o teor de SST por meio do índice de refração da luz ao passar pela solução, o que resulta na formação de uma região iluminada logo abaixo do valor que representa o conteúdo de SST da solução. A escala de medição varia de acordo com a capacidade do refratômetro, porém, em geral, se mantém entre 0 e 30° Brix.

3.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Diferentes configurações de cultivo foram realizadas para os ensaios de hidrólise enzimática, a fim de comparar a influência de cada subproduto do pré-tratamento alcalino. Tendo em vista o alto teor de lignina presente na composição de ambas as biomassas, o cultivo de *A. niger* foi conduzido, inicialmente, a partir de uma mistura entre os subprodutos do pré-tratamento alcalino, os bagaços tratados secos e moídos e os licores filtrados. Na sequência, foi experimentado o cultivo empregando somente os bagaços tratados como fonte de carboidratos para a hidrólise enzimática.

Além disso, como forma de disponibilizar maior diversidade de nutrientes para manutenção e reprodução de *A. niger*, os sólidos e licores foram adicionados a meio mínimo, preparado conforme descrito por Silva (2018). A um litro de água deionizada, foram incorporados 7 gramas de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 2 gramas de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 0,5 gramas de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 grama de sulfato de amônio ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,6 gramas de extrato de levedura (SILVA, C. D. O. G., 2018).

Para o cultivo, foram utilizados frascos de vidro de 500 mL, com volume de trabalho de 100 mL, para garantia de aeração do meio. Os bagaços tratados foram incorporados ao meio mínimo em concentração igual a 0,5% em ambas as configurações de cultivo, enquanto que os licores foram diluídos em proporção 1:19, em uma das configurações ensaiadas. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 M e os conjuntos foram submetidos à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos.

3.6.1 Preparo do inóculo

O inóculo de *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi preparado a partir de colônias cultivadas em meio BDA a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 a 15 dias. Os esporos obtidos foram raspados e dispersos em solução salina (NaCl, 0,9%), previamente autoclavada a 121°C por 20 minutos. O cálculo da concentração de esporos por mL de solução foi realizado por contagem em Câmara de Neubauer no microscópio óptico. Aos tratamentos foi transferido volume correspondente a 10^7 esporos por mL de licor, garantindo o mesmo número de esporos em ambas as configurações de cultivo. Os frascos foram mantidos em *shaker* a 110 rpm e $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 dias.

3.6.2 Determinação de Atividade Enzimática

A atividade de celulases (CMCases) foi monitorada diariamente, de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959) e com base nos métodos de Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). Os volumes de ensaio foram reduzidos devido ao volume de trabalho utilizado, porém as proporções de amostras e reagentes foram mantidas para a confiabilidade da análise.

Essa técnica se baseia na quantificação de açúcares redutores (AR) liberados a partir da catálise enzimática de substratos específicos. O grupo carbonil livre presente nesses monossacarídeos os caracteriza como AR e os torna passíveis de identificação a partir da oxidação induzida por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Como resultado, há formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, composto altamente colorido e de alta absorvância de luz, permitindo a quantificação dos açúcares a partir de espectrofotometria (VASCONSELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Nesse caso, a determinação quantificou a porção de glicose liberada por CMCases de *A. niger*, na presença de carboximetilcelulose (CMC). A análise foi conduzida adicionando 5 μL do extrato enzimático bruto obtido dos cultivos realizados a 10 μL de solução de CMC a 0,5% (m/v) e incubando o conjunto por 30 minutos a 50°C em termociclador (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, Applied Biosystems). A interrupção da reação ocorreu por adição de 30 μL de solução de DNS, com agitação vigorosa, e incubação por 5 minutos a 95°C em termociclador. Posteriormente, 150 μL de água destilada foram adicionados ao conjunto, homogeneizados e o volume total foi lido em leitor de microplacas (ION-960, Kasuaki), em comprimento de onda de 492 nm.

Os valores de absorvância obtidos para o branco foram subtraídos dos valores de absorvância para cada amostra lida em duplicata. As curvas de calibração de glicose foram construídas em todas as microplacas lidas, variando as concentrações entre 0 e 0,5 mg/mL. A quantificação dos AR foi realizada mediante equação da reta, gerada pelo editor de planilhas Microsoft® Excel e obtida a partir das medidas de absorvância da curva de calibração.

3.6.3 Dosagem de Proteínas Solúveis

A dosagem de proteínas solúveis também foi realizada diariamente, conforme metodologia de Peterson modificada por Lowry (1951). Essa técnica é baseada na reação entre cobre e as ligações peptídicas das proteínas, que, sob condições alcalinas, produzem Cu^+ . O cátion resultante interage com o reagente de Folin-Ciocalteu, promovendo o aparecimento de uma forte cor azul nas amostras. Embora não totalmente esclarecido, o mecanismo da coloração envolve a redução de fosfomolibdotungstato a heteromolibdênio azul, por meio da oxidação de aminoácidos aromáticos catalisada por cobre (WATERBORG, 2009).

Para o ensaio em microplacas de 96 poços, alíquotas de 20 μL de cada extrato bruto enzimático foram diluídas com água deionizada até completar 100 μL . Juntamente, foram adicionados 100 μL do reagente de Lowry, prosseguindo com homogeneização e repouso por 10 minutos. Em seguida, transferiu-se 50 μL do reagente de Folin aos conjuntos, os quais foram novamente homogeneizados e mantidos em repouso por outros 30 minutos. A absorvância resultante foi mensurada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 620 nm. As curvas de calibração foram ensaiadas, utilizando padrão de albumina (0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μg) em todas as microplacas submetidas à leitura.

Os valores de absorvância obtidos para o branco foram subtraídos dos valores de absorvância para cada amostra lida em duplicata. A concentração de proteínas solúveis foi calculada a partir do fator de calibração médio, obtido por meio da curva de calibração, e foi expressa em mg/mL.

3.6.4 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR)

A análise da concentração de AR realizada tanto para o licor puro, obtido após pré-tratamento e precipitação ácido, quanto ao longo dos dias de cultivo. A técnica se baseia na metodologia descrita por Santos *et al* (2017), e utiliza os princípios da oxidação induzida por DNS para quantificar açúcares, como glicose, a partir de pequenos volumes amostrais, em microplaca de 96 poços. Para isso, 15 μL da fração líquida foi adicionada a 15 μL de DNS e incubada por 5 minutos a 95°C em termociclador. Posteriormente, 200 μL de água destilada foram adicionados aos conjuntos, que foram homogeneizados e o volume total foi lido em leitor de microplacas, em comprimento de onda de 492 nm.

Os valores de absorvância obtidos para o branco foram subtraídos dos valores de absorvância para cada amostra lida em duplicata. A concentração de AR foi calculada a partir equação da reta, gerada pelo editor de planilhas Microsoft® Excel e obtida por meio das medidas de absorvância da curva de calibração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção do trabalho descreve os resultados obtidos a partir da metodologia desenvolvida, confrontando-os com reportes já realizados na literatura. Além disso, compara o desempenho dos bagaços de maçã e uva utilizados como fonte de carboidratos para sacarificação e fermentação.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BAGAÇOS DE MAÇÃ E UVA

O conhecimento das características físico-químicas dos resíduos lignocelulósicos é imprescindível para a otimização dos procedimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa. A partir da quantificação das frações de celulose, hemicelulose e lignina é possível determinar a compatibilidade e o potencial de aplicação dos resíduos no processo de bioconversão (ANUKAM; BERGHEL, 2021).

Os resíduos de maçã e uva eram compostos principalmente por cascas e sementes, mas também continham pequenas porções de haste/engajo, de acordo com a natureza de cada fruta (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Bagaço de maçã



Fonte: Autora (2022). À esquerda está representado o bagaço *in natura* já seco. À direita está o resíduo moído, constituído de partículas de, no máximo, 700 μm de diâmetro.

Figura 9 - Bagaço de uva



Fonte: Autora (2022). À esquerda está representado o bagaço *in natura* já seco. À direita está o resíduo moído, constituído de partículas de, no máximo, 700 μm de diâmetro.

Conforme Figuras 8 e 9, processos de moagem e peneiramento foram aplicados a cada biomassa. Um moinho de facas e uma peneira, foram utilizados para a obtenção de uma espécie de “farinha” de cada bagaço, composta por partículas de 200 a 700 μm de diâmetro. A moagem resulta em aumento da área superficial total e aumento da eficiência na transferência de calor e massa, otimizando a performance de tratamentos químicos aplicados sequencialmente (BAJPAI, 2016).

Um estudo aplicado a amostras de farelo de trigo evidenciou aumento na remoção de lignina e hemicelulose, conforme houve redução do tamanho das partículas. Quando submetidas a tratamento alcalino com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 30 minutos, partículas moídas em moinho de bolas com tamanho próximo a 1 e 0,5 mm demonstraram redução em 65,88 e 67,25% do conteúdo de lignina inicial, respectivamente (QU *et al.*, 2017). Dessa forma, as técnicas de redução do tamanho dos bagaços utilizados nesse trabalho, podem ter contribuído para o aumento da eficiência do pré-tratamento alcalino e da hidrólise seguinte.

A composição da biomassa lignocelulósica e a distribuição dos polímeros principais que a constituem variam conforme a fonte, as condições climáticas e de manejo, a espécie, a cultivar em questão (ANUKAM; BERGHEL, 2021; BAJPAI, 2016), assim como o método empregado para a quantificação. A Tabela 3 contém os resultados da caracterização de ambos os bagaços.

Tabela 3 - Composição físico-química dos bagaços de uva e maçã

Constituintes Físico-Químicos	Teor (%)
Maçã	
Umidade	5,86 ± 0,36
Cinzas	1,60 ± 0,23
Extrativos	34,96 ± 0,89
Lignina Ácido-Insolúvel	7,84 ± 0,31
Lignina Ácido-Solúvel	1,63 ± 0,34
Hemicelulose	12,80
Celulose	4,80
Uva	
Umidade	4,95 ± 0,17
Cinzas	4,31 ± 0,17
Extrativos	31,44 ± 1,76
Lignina Ácido-Insolúvel	21,25 ± 0,34
Lignina Ácido-Solúvel	3,73 ± 0,14
Hemicelulose	22,00
Celulose	10,15

Fonte: Autora (2022). ± representa o erro padrão calculado para cada ensaio em conjuntos de duplicatas.

De acordo com a Tabela 3, ambas biomassas apresentaram baixos teores de umidade. Esses resultados são inferiores ao reportado por Nascimento *et al* (s.d.), que encontraram 68,8 ± 1,07% de umidade para cascas de uva Syrah, assim como do valor obtido por Dhillon *et al* (2012) para o bagaço de maçã, o qual exibiu em torno de 71% de umidade. A diferença ocorre porque os resíduos utilizados para a realização dos experimentos foram cedidos previamente secos, possibilitando a exclusão da etapa de secagem, anterior ao processo de moagem.

Quanto ao teor de cinzas (Tabela 3) o bagaço de maçã apresentou valor que corresponde com a faixa encontrada por Dhillon *et al* (2012), cuja pesquisa reportou conteúdo de cinzas de resíduos de maçã entre 0,5 e 6,1%. Para o bagaço de uva, o teor de cinzas encontrado (Tabela 4) se aproxima do conteúdo verificado para o bagaço fermentado da cultivar híbrida interespecífica ‘Chambourcin’, o qual continha 4,52 ± 0,07% de cinzas (JIN *et al.*, 2018).

As diferenças encontradas entre os bagaços estudados revelam maior teor de cinzas para o derivado de uva. Tal resultado pode estar relacionado aos diferentes tratamentos fitossanitários aplicados para ambas culturas, já que as cinzas representam a fração de compostos inorgânicos presente nos resíduos (ABO *et al.*, 2019). A presença de minerais em maior quantidade pode contribuir com a atividade de *Aspergillus niger*, fornecendo compostos necessários para o metabolismo microbiano, incluindo cofatores enzimáticos.

Ainda conforme Tabela 3, o bagaço de maçã exibiu teor de extrativos 17% superior ao quantificado por Jin *et al* (2019), que obtiveram $29,7 \pm 1,6\%$ para resíduos de maçã submetidos à extração Soxhlet utilizando etanol 95% (v/v) como solvente. O mesmo grupo, ao estudar o potencial de resíduos da cultivar de uva ‘Chambourcin’ para produção de óleo, polifenóis e bioprodutos, em 2018, encontrou $28,62 \pm 1,54\%$ de extrativos, valor inferior comparado ao obtido nesse trabalho para o bagaço de uva.

A fração de extrativos presente na biomassa lignocelulósica engloba componentes não-estruturais, como resinas, triglicerídeos, ácidos graxos, esteróis e compostos fenólicos (NANDA; VO; SARANGI, 2020). Além de possuírem valor agregado, muitos desses compostos atuam como inibidores das atividades enzimática e microbiana, reduzindo a eficiência do processo de obtenção de etanol 2G. A presença de maior teor de extrativos no bagaço de maçã pode acarretar em maior concentração de compostos inibidores no licor resultante do pré-tratamento, levando à diminuição da atividade enzimática.

Os teores de lignina ácido-solúvel e ácido-insolúvel encontrados para o bagaço de maçã (Tabela 3) são inferiores aos constatados por Gustafsson *et al* (2019), grupo que investigou o potencial de resíduos de maçã na construção de biofilmes e objetos 3D, verificando $16,43 \pm 0,12\%$ de lignina insolúvel e $6,51 \pm 0,12\%$ de lignina solúvel. A fração de lignina verificada para o bagaço de uva (Tabela 3) também foi mais baixa em comparação à encontrada por Teles *et al* (2018) para o bagaço fermentado da variedade ‘Alicante Bouschet’, que apresentou $40,24 \pm 0,59\%$ de lignina total.

A lignina atua como uma barreira física na matriz lignocelulósica. Além de impedir que hemicelulases e celulases acessem os polissacarídeos da parede celular vegetal, a molécula também afeta a síntese dessas enzimas por microrganismos, fatores que reduzem a eficiência do processo de hidrólise (BAJPAI, 2016; LADEIRA-ÁZAR *et al.*, 2019). O alto conteúdo de lignina quantificado para ambas as biomassas utilizadas nesse trabalho, demonstra seus baixos potenciais para hidrólise e sacarificação *in natura* e corrobora com os resultados de atividade

enzimática obtidos para essas biomassas, ressaltando a importância da aplicação de pré-tratamentos para remoção desse polímero e aumento do acesso aos carboidratos de interesse.

De acordo com a Tabela 3, o teor de hemicelulose encontrado para o bagaço de maçã se aproxima do resultado obtido por Pathania, Sharma e Handa (2018), que reportaram 11% de hemicelulose para resíduos de maçã. Entretanto, a fração de celulose verificada pelo grupo no mesmo reporte foi mais de sete vezes superior aos 4,80% quantificado nesse trabalho. Para o bagaço de uva também foram encontradas divergências, visto que El Achkar *et al* (2016) encontraram frações de hemicelulose e celulose iguais a 6,70 e 7,50%, respectivamente, para o bagaço fermentado da variedade ‘Cabernet Franc’.

Os carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica representam as maiores fontes de carbono renovável para a produção de etanol de segunda geração. A composição em hemicelulose e celulose desempenha um papel crucial na indução da atividade de diferentes grupos enzimáticos, ao longo de cultivos submersos. De forma geral, resíduos com altos teores de hemicelulose resultam em maiores atividades de enzimas hemicelulases, por exemplo, embora também já tenha sido reportado aumento induzido por alto conteúdo de celulose (SILVA, C. de O. G.; FILHO, 2017).

Muitas enzimas hidrolíticas, como hemicelulases e celulasas fúngicas, possuem uma estrutura anexa, denominada módulo de ligação à carboidrato (CBM). Quando presente, CBM tem a propriedade de ancorar as enzimas em moléculas de hemicelulose ou celulose, permitindo contato eficiente. Embora não existam evidências sobre aumento da ação de enzimas pela presença de CBMs e sua relação com funções hidrolíticas (PASIN *et al.*, 2020), altos teores de carboidratos em biomassas aumentam a área disponível para ancoragem das enzimas, resultando em maior atividade enzimática. Dessa forma, as maiores proporções de celulose e hemicelulose encontradas para o bagaço de uva nesse trabalho revelam maior potencial de indução de atividade enzimática por parte desse resíduo, em comparação ao bagaço de maçã.

4.2 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

Para o pré-tratamento alcalino, soluções de 2,5 e 5% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) foram aplicadas aos bagaços de uva e maçã em proporção 1:10 e os conjuntos foram

submetidos à autoclavagem a 121°C por 30 minutos. As Figuras 10 e 11 ilustram os conjuntos de sólidos e hidróxido de sódio, anteriormente e após o pré-tratamento em autoclave.

Figura 10 - Sólidos e soluções de NaOH anteriormente ao pré-tratamento em autoclave



Fonte: Autora (2022). Os frascos ao fundo continham bagaço de maçã, enquanto os frascos à frente continham bagaço de uva.

Figura 11 - Sólidos e licor exatamente após o pré-tratamento em autoclave



Fonte: Autora (2022). Os frascos ao fundo continham bagaço de maçã, enquanto os frascos à frente continham bagaço de uva. As setas brancas indicam a mudança de coloração dos sólidos obtidos pelo método de pré-tratamento alcalino.

De acordo com a Figura 11, o uso de hidróxido de sódio provocou remoção de grande parte da lignina e de compostos de cor presentes na biomassa. Como resultado, obtiveram-se sólidos de cor clara (setas brancas na Figura 11), intitulados BMT-2,5% para o bagaço de maçã pré-tratado com NaOH 2,5% (m/v), BMT-5% para o bagaço de maçã pré-tratado com NaOH 5% (m/v), BUT-2,5% para o bagaço de uva pré-tratado com NaOH 2,5% (m/v) e BUT-5% para

o bagaço de uva pré-tratado com NaOH 5% (m/v). As biomassas *in natura* foram chamadas BMN para o bagaço de maçã e BUN para o bagaço de uva.

A morfologia dos sólidos, após lavagem, variou de acordo com a natureza da biomassa estudada (Figuras 12, 13 e 14).

Figura 12 - Aspectos morfológicos de BMT-2,5% e BMT-5%



Fonte: Autora (2022). BMT = bagaço de maçã pré-tratado. À esquerda está representado o aspecto morfológico de BMT-2,5%. À direita está representado o aspecto morfológico de BMT-5% (m/v).

Conforme representado pela Figura 12, em ambas condições, o bagaço de maçã pré-tratado úmido apresentou aspecto viscoso e gelatinoso. Essa biomassa, além de conter os polímeros principais, também possui frações de pectina (4 a 14%) e amido (14 a 17%), moléculas que, quando dissolvidas entre fibras de celulose, possibilitam a confecção de biopolímeros e biofilmes (GUSTAFSSON *et al.*, 2019).

Após o tratamento alcalino também foi observado o aumento do tamanho das partículas. Tal evidência corrobora com Qu *et al* (2017), que reportaram significativo aumento do diâmetro de partículas de palha de milho, quando submetidas a tratamento alcalino com hidróxido de sódio 1% (m/v) a 100°C durante diferentes tempos de incubação. Inicialmente com tamanho abaixo de 800 μm , após 30 minutos de tratamento, as partículas chegaram a 1,3 milímetros de diâmetro (QU *et al.*, 2017).

A presença de pectina e amido, somada ao aumento das partículas devido ao tratamento, contribuíram para a morfologia do bagaço de maçã pré-tratado após a secagem em estufa, o qual formou aglomerados de alta rigidez e dificultou o processo de moagem, resultando em partículas grandes e grosseiras (Figura 13).

Figura 13 - Aspectos morfológicos de BMT-2,5% seco



Fonte: Autora (2022). BMT = bagaço de maçã pré-tratado. À esquerda está representado o aspecto morfológico de BMT-2,5% logo após ser retirado da estufa. À direita o mesmo tratamento após moagem em almofariz e pistilo.

De maneira diferente, o bagaço de uva pré-tratado apresentou-se arenoso após a lavagem (Figura 14). Esse aspecto colaborou com o processo de moagem, permitindo rendimento de um maior número de partículas, com tamanho reduzido. Dessa forma, otimizou-se a área superficial disponível para a ancoragem e ação de enzimas hidrolíticas.

Figura 14 - Aspectos morfológicos de BUT-2,5% seco



Fonte: Autora (2022). BUT = bagaço de uva pré-tratado. À esquerda está representado o aspecto morfológico de BMT-2,5%. À direita o mesmo tratamento já seco e moído em almofariz e pistilo.

Além dos sólidos, o segundo subproduto do pré-tratamento foi o licor, rico em lignina, altamente alcalino e viscoso (Figura 15). Assim como os sólidos, os licores obtidos foram intitulados LM-2,5% e LM -5% para os licores provenientes dos tratamentos com bagaço de maçã e LU-2,5% e LU-5% para aqueles resultantes dos tratamentos com bagaço de uva.

Figura 15 - Licor negro filtrado em coador simples de pano



Fonte: Autora (2022).

Essa fração líquida pode ser comparada ao licor negro obtido no processo de polpação soda para produção de fibras de celulose. A técnica é precursora do método Kraft e explora a capacidade de degradação da lignina e partes da hemicelulose de materiais lenhosos, pelo emprego de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). O método, quando empregado em biomassas lignocelulósicas, leva à remoção da lignina, mantendo a estrutura dos polissacarídeos. Mesmo que não possua atividade de solubilização total de celulose e hemicelulose, a técnica facilita a ação de enzimas hidrolíticas sobre esses carboidratos (LADEIRA-ÁZAR *et al.*, 2019).

O mecanismo de degradação da lignina ainda não é totalmente esclarecido, devido à natureza amorfa e constituição distinta da molécula de acordo com o tecido vegetal (MAENPUEN *et al.*, 2017). A grande maioria das ligações presentes na molécula de lignina são do tipo aril-éter e aril-alkil-éter (MAENPUEN *et al.*, 2017), cuja clivagem pode ser alcançada a partir da aplicação de soluções de hidróxido de sódio (MUTHUVELU *et al.*, 2019).

Os produtos de degradação da lignina são compostos fenólicos, geralmente, derivados de fenilpropanóides do tipo guaiacol. Embora apresentem habilidade que envolve a absorção de proteínas e, conseqüentemente, impedimento da atividade de enzimas (GONZÁLEZ-BAUTISTA *et al.*, 2017), esses compostos são flavorizantes, altamente antioxidantes e alguns apresentam atividade antitumoral (MAENPUEN *et al.*, 2017).

Dessa forma, a precipitação ácida foi empregada para reduzir a concentração de lignina e derivados do licor negro obtido e recuperá-la como produto de valor agregado. A média de recuperação da lignina nas amostras de 14 mL de licor negro de bagaço de maçã variou de 20,33% para LM-5% a 22,14% para LM-2,5%, levando em consideração a lignina total teórica que poderia ser extraída dos resíduos a partir do pré-tratamento. Para o bagaço de uva, foi

possível precipitar 16,75% da lignina teórica em LU-2,5% e 11,64% da lignina teórica em LU-5% a partir das amostras de 14 mL.

Para ambos os resíduos, houve maior precipitação de lignina quando se utilizou hidróxido de sódio a 2,5% (m/v). De acordo com Júnior (2020), o aumento do rendimento da lignina no processo de precipitação é diretamente proporcional à concentração de íons H^+ adicionada. Os pHs medidos para todos os tratamentos apontaram valores menores para LM-2,5% e LU-2,5%, em comparação aos tratamentos com NaOH 5% (m/v), o que explica a diferença de rendimento obtida.

Tendo em vista os volumes totais obtidos de cada licor, foram realizadas estimativas da remoção da lignina dos bagaços, com base nos resultados supracitados. Dessa forma, mais de 66% da lignina constituinte do bagaço de maçã poderia ser removida por meio do pré-tratamento alcalino, a partir do pré-tratamento com NaOH 2,5% (m/v), enquanto que, utilizando NaOH 5% (m/v), seria possível reduzir em 60% a fração. O mesmo método aplicado ao bagaço de uva poderia reduzir até 67% e 46% da lignina, empregando NaOH 2,5% (m/v) e NaOH 5% (m/v), respectivamente.

Ladeira-Ázar *et al* (2018) investigaram a aplicação de pré-tratamento alcalino a bagaço de cana-de-açúcar, utilizando hidróxido de sódio 1,5% (m/v) e submetendo o conjunto à autoclave a 121°C por 60 minutos. Foi constatada redução de 38% da fração de lignina presente no resíduo e aumento nas proporções de xilana e glucano para 26 e 37%, respectivamente. As estimativas realizadas por meio dos resultados desse trabalho indicam que seria possível reduzir a fração de lignina dos bagaços de maçã e uva em até 66 e 67%, respectivamente, empregando NaOH 2,5%.

De forma a quantificar a influência da lignina na medida de sólidos solúveis totais presentes nos licores, foram medidos os valores de °Brix antes e após a precipitação. A Tabela 4 reflete as mudanças atreladas à precipitação da lignina.

Tabela 4 - Sólidos Solúveis Totais antes e após a Precipitação Ácida

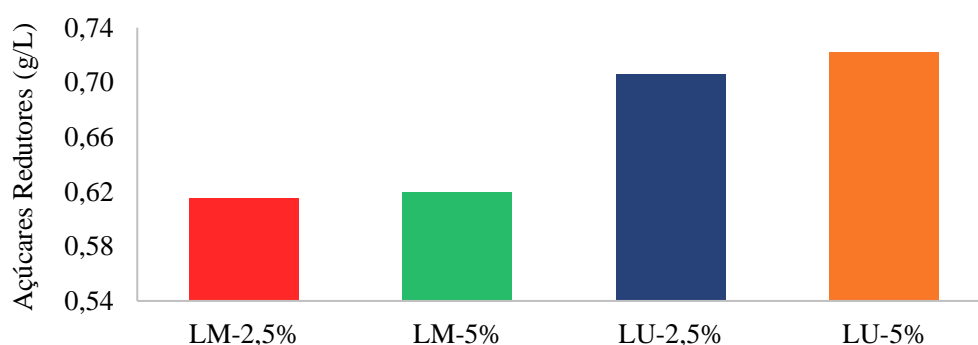
Tratamento	Licor	Média de °Brix antes da precipitação	Média de °Brix após a precipitação
1	LM-2,5%	9,33	7,92
2	LM-5%	12,83	11,08
3	LU-2,5%	10,00	7,50
4	LU-5%	13,50	10,08

Fonte: Autora (2022).

A partir da Tabela 4, observa-se redução da medida de °Brix em aproximadamente 15% para os tratamentos com bagaço de maçã, enquanto o bagaço de uva apresentou queda de 25% no mesmo parâmetro analisado, para ambos os tratamentos. Dessa forma, é possível afirmar que a lignina solubilizada em LU influencia em maior grau a medida de °Brix, quando comparada à lignina presente em LM.

O princípio da mensuração de °Brix também é capaz de apontar a concentração de açúcares presentes em soluções. O Gráfico 1 apresenta a concentração de AR nos licores obtidos a partir do pré-tratamento alcalino e após precipitação ácida. O método de mensuração foi baseado na oxidação por DNS.

Gráfico 1 - Concentração de AR nos licores obtidos a partir do pré-tratamento alcalino



Fonte: Autora (2022).

De acordo com o Gráfico 1, não houve diferença entre LM-2,5 e 5%, cujo valor se manteve próximo de 0,620 g/L para ambos os licores. No caso dos licores derivados do bagaço de uva, LU-2,5% apresentou concentração de AR 2% menor em comparação a LU-5%, cuja mensuração apontou 0,722 g/L. Assim, pode-se afirmar que as diferenças de °Brix mensuradas são devidas à presença de outros compostos solubilizados, não somente lignina e açúcares.

Niz da Silva (2016) aplicou pré-tratamento alcalino com NaOH 4,5% sobre bagaço da uva 'Cabernet Franc', obtendo rendimento igual a 0,54 g/L de glicose, a partir do método de mensuração por glicose oxidase. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram maior rendimento de açúcares, já que foi possível obter mais de 0,7 g/L a partir do bagaço de uva 'Bordô', pré-tratada com NaOH 5% (m/v). Entretanto, a técnica utilizada para mensuração é inespecífica, já que o reativo DNS não oxida somente glicose, mas reage com a porção total de

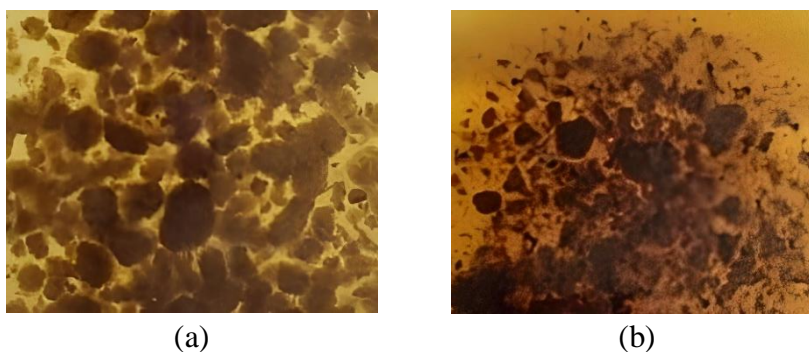
AR existentes em solução. Assim, é possível que a maior concentração encontrada seja resultado da presença de outros açúcares nos licores.

4.3 CULTIVO E CRESCIMENTO SUBMERSO DE *Aspergillus niger*

O cultivo submerso de *Aspergillus niger* para a produção de enzimas hidrolíticas e sacarificação dos resíduos, foi performedo em diferentes condições. Inicialmente, 0,5 gramas de cada bagaço tratado (BMT-2,5%, BMT-5%, BUT-2,5% e BUT-5%) e 5 mL do respectivo licor (LM-2,5%, LM-5%, LU-2,5% e LU-5%), após precipitação da lignina, foram adicionados a 95 mL de meio mínimo, em triplicata. Nesse mesmo conjunto também foram ensaiados cultivos contendo os bagaços *in natura*, de forma a entender a influência do pré-tratamento alcalino sobre a atividade enzimática final. Um controle negativo, contendo somente meio mínimo, também foi ensaiado. Em seguida, foram performedas fermentações submersas contendo somente 0,5 gramas de cada bagaço dispersos em meio mínimo, a fim de evidenciar o perfil de crescimento e atividade enzimática de *A. niger* em ausência de glicose. Esse conjunto também conteve cultivos dos bagaços *in natura* e um controle negativo.

O crescimento do fungo ao longo da fermentação submersa foi evidenciado pelo aparecimento de aglomerados (pellets) de diferentes tamanhos, conforme o cultivo investigado. Essa morfologia predomina em cultivos de *A. niger*, já que os esporos tendem a se aglomerar conforme ocorre sua germinação (BUFFO *et al.*, 2020). A Figura 16 ilustra as morfologias observadas no sexto dia de fermentação.

Figura 16 - Aspectos morfológicos de *A. niger* cultivado em sólidos e licores derivados dos bagaços de maçã e uva pré-tratados



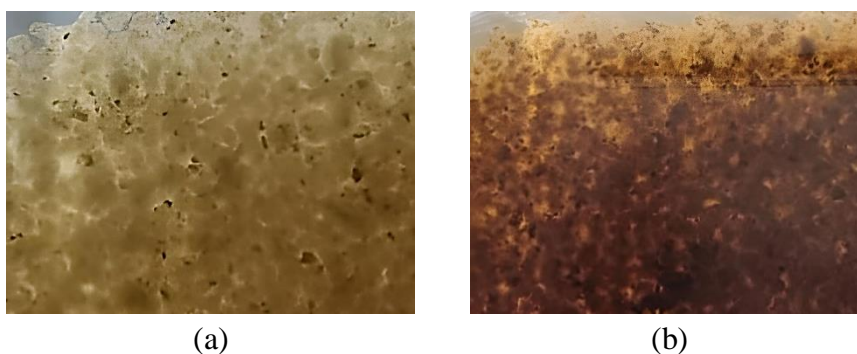
Fonte: Autora (2022). (a) Pellets de *A. niger* formados em meio contendo BMT-5% + LM-5%. (b) Pellets de *A. niger* formados em meio contendo BUT-2,5% + LU-2,5%.

Conforme Figura 16, o fungo demonstrou crescimento variável de acordo com o tratamento. Nas fermentações conduzidas com sólidos e licores derivados do bagaço de maçã, independente do pré-tratamento aplicado, *A. niger* formou menor número de aglomerados, cujo tamanho foi maior (Figura 16a) comparado aos pellets formados nas fermentações derivadas do bagaço de uva (Figura 16b). Nesse caso, foram constatados numerosos pellets, mas de diâmetro menor.

Gürler *et al* (2020) estudaram o efeito inibidor de fenol na produção de inulinase por *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447). O grupo constatou que o aumento da concentração de fenol no meio diminui o tamanho dos pellets formados pelo fungo e, por consequência, diminui drasticamente a atividade de inulinase. Tendo em vista a riqueza de compostos fenólicos constituintes naturais do bagaço de uva, é possível que a redução no tamanho dos pellets tenha ocorrido por ação desses compostos, além dos inibidores formados a partir do pré-tratamento alcalino.

Por outro lado, diversos reportes demonstram que o controle do tamanho dos pellets formados por *A. niger* resulta em aumento do rendimento de compostos de interesse, como ácido cítrico e enzimas. Suspensões miceliais dispersas são preferíveis, porque a formação de grandes aglomerados aumenta a resistência à difusão de oxigênio e nutrientes do meio, limitando a atividade do fungo e, consequentemente, a produção de enzimas (BUFFO *et al.*, 2020). Ao analisar as fermentações conduzidas com os bagaços *in natura*, também foi observado número largamente expressivo de aglomerados, com menor diâmetro (Figura 17a e b).

Figura 17 - Aspectos morfológicos de *A. niger* cultivado em bagaço de maçã e uva *in natura*

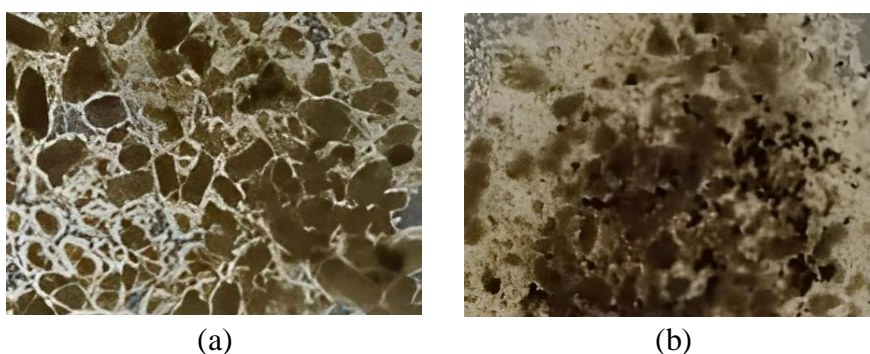


Fonte: Autora (2022). (a) Pellets de *A. niger* formados em meio contendo bagaço de maçã *in natura*. (b) Pellets de *A. niger* formados em meio contendo bagaço de uva *in natura*.

Ambas biomassas *in natura* disponibilizaram maior concentração de açúcares para o crescimento de *A. niger*. Pouco se sabe acerca da influência da concentração de glicose sobre a morfologia de *Aspergillus niger*, especulações explicam que ao disponibilizar maior concentração de substratos simples inicialmente, há estímulo para reprodução e aumento do número de pellets, em oposição à indução da atividade enzimática. Outros parâmetros como agitação e pH também podem influenciar a morfologia de *A. niger*, entretanto, todos os cultivos foram realizados no mesmo momento e sob as mesmas condições de pH, agitação e temperatura.

A morfologia dos cultivos contendo somente BMT-2,5%, BMT-5%, BUT-2,5% e BUT-5% dispersos em meio mínimo, sem a presença dos licores, exibiu perfil semelhante ao descrito para o primeiro cultivo. Pellets maiores foram formados na fermentação empregando BMT (Figura 18a), enquanto que houve maior dispersão de aglomerados em BUT (Figura 18b).

Figura 18 - Aspectos morfológicos de *A. niger* cultivado em bagaço de maçã e uva pré-tratados



Fonte: Autora (2022). (a) Pellets de *A. niger* formados em meio contendo BMT-5%. (b) Pellets e dispersões de *A. niger* formados em meio contendo BUT-5%.

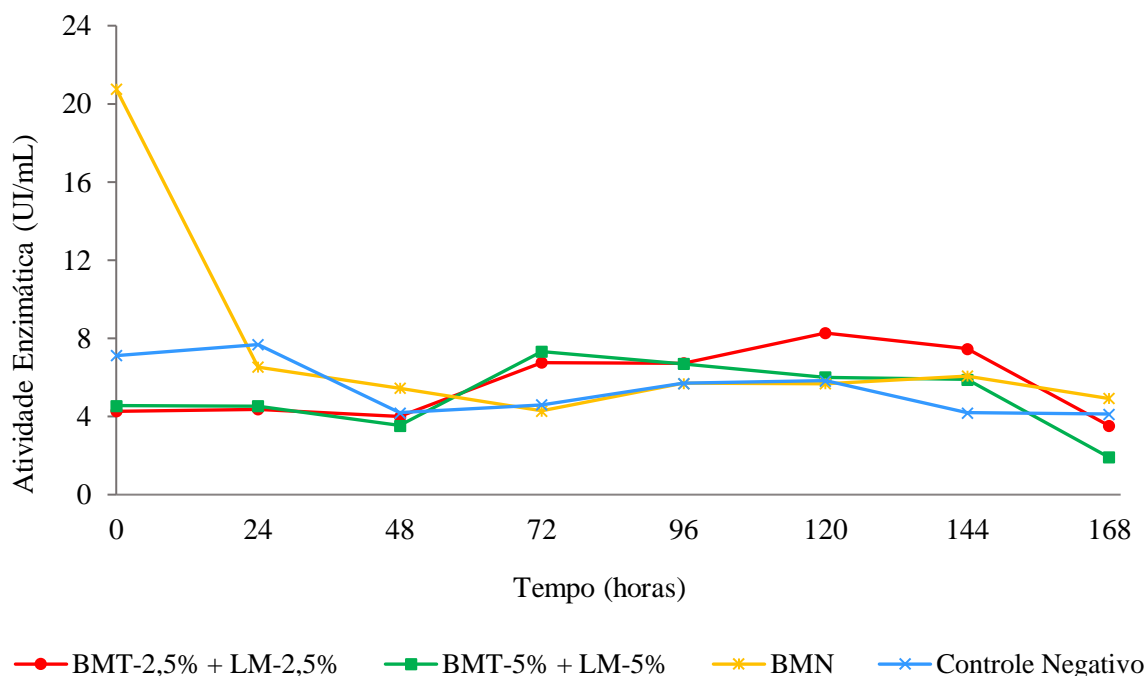
Tendo em vista os parâmetros de reação, a não utilização de licores e a condição dos sólidos após lavagem, secagem e moagem, pode-se afirmar que a morfologia de crescimento de *A. niger* não é somente influenciada por alta concentração de compostos fenólicos, mas também pode ser modulada pela composição química dos sólidos a serem hidrolisados. Os resultados obtidos a partir da caracterização da biomassa indicam maiores conteúdos de celulose e hemicelulose para o bagaço de uva, enquanto que o bagaço de maçã exibiu quantidades menores de ambos os carboidratos, característica fundamental para a indução da

síntese de enzimas celulases e hemicelulases, produzidas em maior quantidade quando o fungo mantém seu crescimento em pellets menores e mais dispersos.

4.4 PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Aspergillus niger* CULTIVADO EM BAGAÇO DE MAÇÃ E UVA PRÉ-TRATADOS E SUPLEMENTADOS COM LICOR

O Gráfico 2 ilustra o perfil de atividade das enzimas produzidas por *Aspergillus niger* ao longo dos sete dias de fermentação submersa em BMT e seus respectivos licores. Alta atividade enzimática foi observada para BMN no momento da inoculação de *A. niger*. Embora o método de mensuração da atividade enzimática a partir da oxidação induzida por DNS seja o mais comumente utilizado em estudos semelhantes a esse, moléculas interferentes podem desviar os resultados do ensaio (KING *et al.*, 2009).

Gráfico 2 - Atividade de CMCase em meio contendo sólidos (BMT) e licores (LM) derivados do bagaço de maçã



Fonte: Autora (2022).

A concentração de pentoses e hexoses presentes no meio pode ter superestimado a atividade de CMCases no tempo 0 para BMN, já que o reagente DNS pode ter oxidado não somente os açúcares liberados ao longo da incubação com CMC 0,5%, mas também os açúcares constituintes da biomassa *in natura*. Mesmo que o perfil tenha apontado valores iniciais exorbitantes para a atividade de CMCCase em BMN, houve drástica queda nas primeiras 24 horas, mantendo-a abaixo do alcançado a partir de BMT e indicando reduzido potencial de BMN para indução de enzimas carboidrases.

Elevadas concentrações de açúcares, inicialmente, podem não ser ideais para tal finalidade. Reportes apontam a ausência de glicose como estímulo para a produção de enzimas celulases (DAS *et al.*, 2013; DHILLON *et al.*, 2012), comportamento que não ocorre em meio com excesso desse substrato. Nesses casos, especulações explicam o favorecimento da reprodução do fungo, em detrimento da secreção de enzimas, afirmação que corrobora com os aspectos morfológicos de *A. niger* cultivado em ambos os bagaços *in natura* (Figuras 17a e b).

Ainda segundo o Gráfico 2, o controle negativo demonstrou, nas primeiras 24 horas de cultivo, a maior atividade de CMCCase nesse tempo, alcançado 7,68 UI/mL. O meio mínimo preparado para todos cultivos conteve cinco fontes diferentes de nutrientes, dentre eles sulfato de amônio, cuja presença interfere na taxa metabólica de microrganismos. Diversos reportes acerca de influência de fontes nitrogenadas na produção de enzimas já foram publicados.

Sataphaty *et al* (2021) reportaram a influência de fontes nitrogenadas na atividade de pectinase de *Aspergillus parvisclerotigenus* SSB9, constatando que a presença de sulfato de amônio garantiu mais de 1000 UI/mL de atividade de pectinase. O extrato de levedura, adicionado ao meio mínimo utilizado nesse trabalho também garantiu altas taxas metabólicas para *Aspergillus fumigatus* ABK9. Quando utilizado a 0,3% (m/v), em conjunto de 1% de CMC (m/v), foi capaz de induzir a produção de 120 UI/mL de CMCases (DAS *et al.*, 2013). Dessa forma, os nutrientes presentes no meio mínimo podem ter induzido a expressão de CMCases no controle negativo, ao longo das primeiras 24 horas de cultivo.

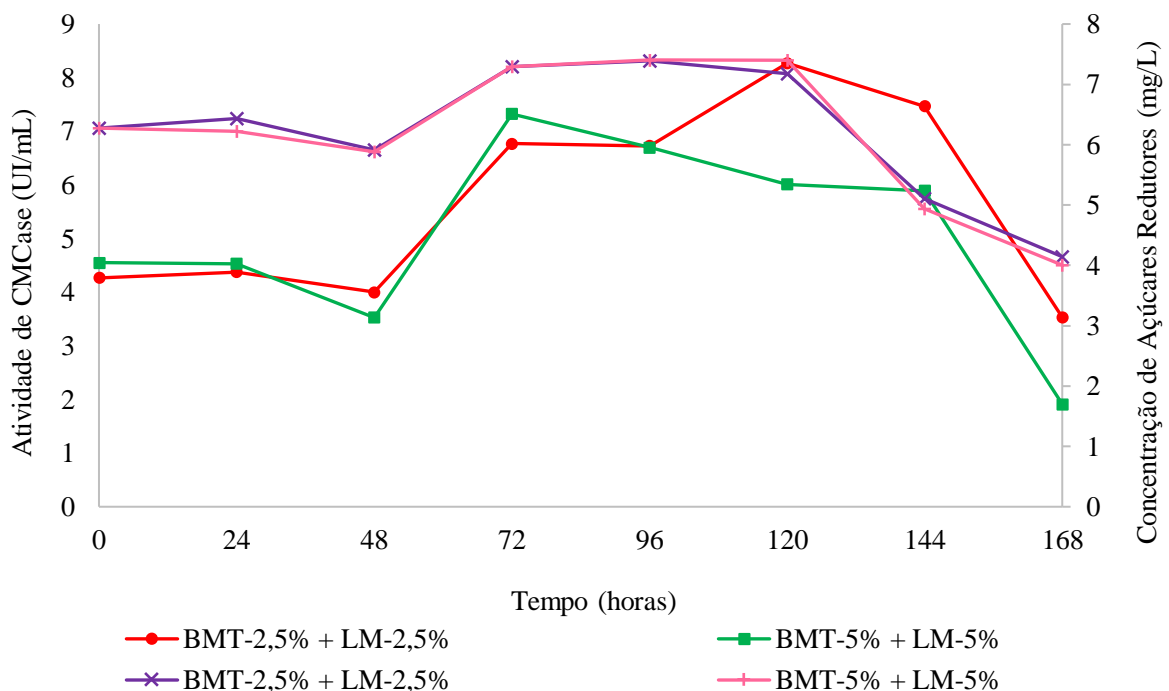
Ao terceiro dia de fermentação, o tratamento que recebeu BMT-5% + LM-5% apresentou expressiva atividade de CMCases, alcançando 7,32 UI/mL. Diferentemente, o cultivo que conteve BMT-2,5% + LM-2,5% apresentou pico de atividade ao quinto dia, com 8,27 UI/mL de atividade de CMCases, mesmo demonstrando perfil semelhante ao cultivo com BMT-5% + LM-5% ao longo das primeiras 96 horas.

As celulasas secretadas ao longo dos experimentos descritos se mostram em níveis mais baixos quando comparadas a estudos publicados. Dhillon *et al* (2012) cultivaram *Aspergillus niger* NRRL 567 em bagaço de maçã suplementado com 1% de cascas de arroz, sob fermentação em estado sólido e obtiveram atividade de CMCases próximas a 130 UI por grama de substrato (DHILLON *et al.*, 2012).

Considerando que foram utilizados 0,5 gramas de substrato para o cultivo de *A. niger* e alcançou-se 8,27 UI/mL no tratamento BMT-2,5% + LM-2,5%, a atividade de CMCases por grama de substrato nesse caso foi de 16,54 UI, resultados acima de reportes já publicados na literatura. Pathania, Sharma e Handa (2018) utilizaram bagaço de maçã pré-tratado em micro-ondas, para produção de enzimas carboidrases, a partir de *Rhizopus delemar* F2, isolado no mesmo estudo. O grupo encontrou pico de 11,90 UI/g de atividade de CMCases para o bagaço de maçã exposto a 450 W de micro-ondas por 1 minuto (PATHANIA; SHARMA; HANDA, 2018).

O Gráfico 3 ilustra os resultados obtidos quanto ao potencial de sacarificação das enzimas produzidas por *A. niger*, quando cultivado em BMT suplementado com LM.

Gráfico 3 - Perfil de atividade de CMCase e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de maçã pré-tratado (BMT) suplementado com licor (LM)



Fonte: Autora (2022).

Ao comparar o progresso da atividade enzimática (curvas nas cores vermelho e verde) com a concentração de AR livre no meio (curvas nas cores roxo e rosa), é possível observar que os picos de atividade de CMCase ao terceiro dia de cultivo corroboram com o aumento da concentração de AR, que alcança valores máximos de 7,17 e 7,40 mg/L para BMT-2,5% + LM-2,5% e BMT-5% + LM-5%, respectivamente, ao quinto dia de fermentação.

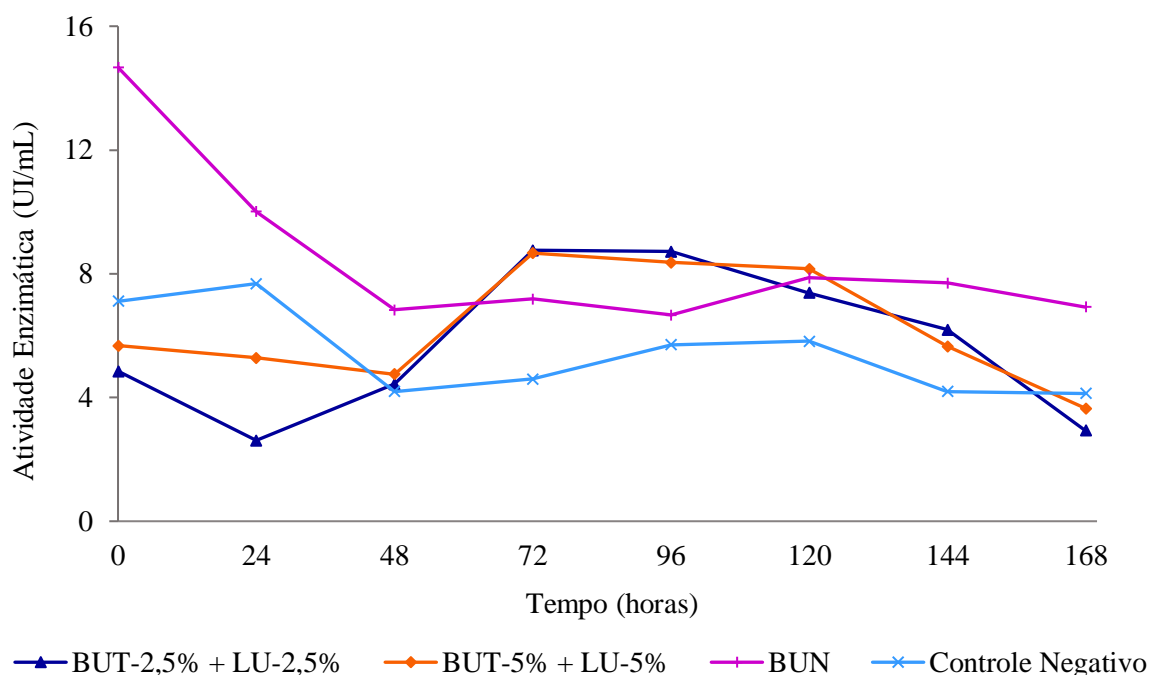
Além disso, o Gráfico 3 ainda apresenta uma queda na concentração de AR, ao segundo dia de fermentação. Ao passo que *A. niger* utilizou açúcares para sua manutenção e reprodução, também secretou enzimas responsáveis pela hidrólise de BMT-2,5 e 5%. A quebra dos carboidratos acarreta em sacarificação do bagaço, processo que explica a estabilidade desse componente nos três dias seguintes de fermentação, mantendo concentrações de AR entre 15,5 e 18% maiores em comparação à concentração inicial. Entretanto, após o quinto dia de cultivo, a concentração de AR sofreu queda para valores próximos a 4 mg/L, indicando que o tempo ideal de fermentação está entre as 72 e as 120 horas.

Juntamente aos cultivos em BMT, também foram conduzidas fermentações utilizando BUT suplementado com LU como fonte de carbono e sob as mesmas condições de agitação e temperatura. O Gráfico 4 ilustra o perfil de atividade enzimática encontrado.

Assim como descrito para o bagaço de maçã *in natura*, o Gráfico 4 apresenta 14,67 UI/mL como a atividade de CMCase para o bagaço de uva *in natura* no tempo 0 de cultivo. A superestimação inicial da atividade pode ser devida ao método utilizado para a mensuração desse parâmetro, assim como ao favorecimento da reprodução do fungo. Entretanto, nesse caso, são observados outros dois picos de atividade enzimática, marcados por 7,18 UI/mL em 72 horas e 7,86 U/mL em 120 horas. Esses resultados demonstram que o bagaço de uva possui potencial para a produção de enzimas hidrolíticas sem necessidade da aplicação de etapas de pré-tratamento.

A partir do Gráfico 4, também se observam padrões semelhantes de atividade enzimática para os tratamentos BUT-2,5% + LU-2,5% e BUT-5% + LU-5%. Ambos os cultivos apresentaram pico de atividade de celulasas em 72 horas, com 8,72 e 8,66 UI/mL, respectivamente, mantendo certa estabilidade até as 96 horas. Diferentemente de BMT, os cultivos com BUT não exibiram segundo pico, reduzindo gradativamente a atividade de CMCase a partir das 120 horas de fermentação.

Gráfico 4 - Atividade de CMCase em meio contendo sólidos (BUT) e licores (LU) derivados do bagaço de uva



Fonte: Autora (2022)

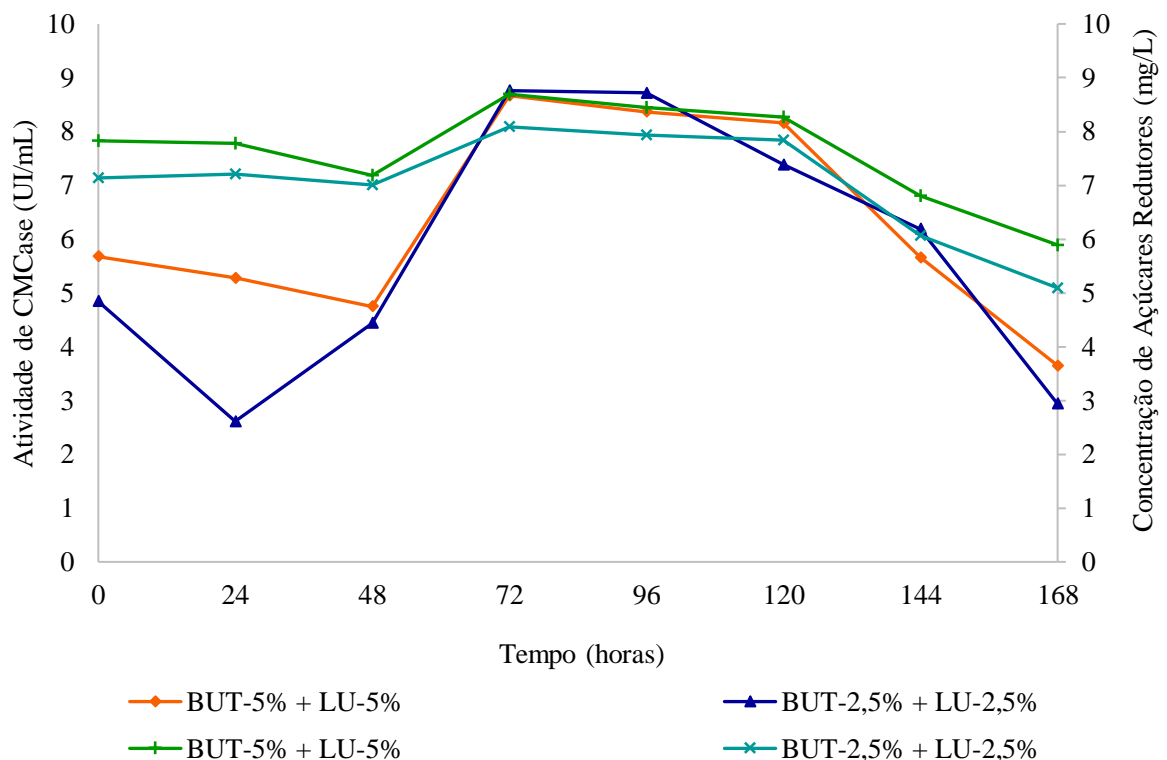
Os resultados obtidos podem ser comparados e também superam reportes já realizados na literatura. Díaz *et al* (2012) investigaram a atividade de celulasas, xilanases e pectinases de *Apergillus awamori* 2B.361 U2/1 sobre a mistura de bagaço de uva branca, da variedade 'Palomino Fino', e cascas de laranja, em proporção 1:1 (m/m). Uma solução nutriente contendo diferentes fontes de carbono, nitrogênio e minerais foi utilizada para conduzir a fermentação submersa. O grupo constatou maior atividade de CMCases no quinto dia de cultivo, sendo igual a $6,2 \pm 0,8$ UI/g de sólidos.

Kurt e Cekmecelioglu (2021) empregaram bagaço de uva fermentado para a obtenção de licor hidrolisado a partir de pré-tratamento com ácido diluído. O hidrolisado foi utilizado integralmente e enriquecido com alguns nutrientes para a inoculação de *Bacillus subtilis* natto DSM 17766, cuja atividade de celulasas foi mensurada utilizando papel filtro como substrato. Após otimizar a produção de celulasas a partir da metodologia de superfície de resposta, ensaios experimentais produziram um máximo de $0,17 \pm 0,013$ UI/mL de celulasas.

Ao plotar o perfil de atividade de CMCases em comparação à variação da concentração de AR livre, foi obtido o Gráfico 5. Assim como ocorreu para o bagaço de maçã, o meio

contendo BUT enriquecido com LU apresentou maior concentração de AR (curvas nas cores azul claro e verde) em 72 horas, tempo em que também houve aumento da atividade de CMCase (curvas nas cores azul escuro e laranja), que exibiu 8,70 UI/mL. A concentração de AR, embora estabilizada nos dois dias seguintes, apresentou queda a partir das 120 horas de fermentação, comportamento semelhante ao cultivo com BMT enriquecido com LM. Isso demonstra que o tempo ideal de cultivo nessas condições se mantém entre o terceiro e o quinto dia de fermentação submersa, para que seja otimizada a atividade enzimática.

Gráfico 5 - Perfil da atividade de CMCase e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de uva pré-tratado (BUT) suplementado com licor (LU)



Fonte: Autora (2022).

Adicionalmente, o aumento da concentração de AR vista tanto em BMT (Gráfico 4) quanto em BUT (Gráfico 5) pode ter acarretado em repressão da atividade celulolítica. As quedas das atividades enzimáticas após 120 horas de cultivo, para ambos os tratamentos, podem ser explicadas pela repressão catabólica da secreção de celulases, que ocorre justamente quando há presença de AR no meio (DAS *et al.*, 2013).

As baixas concentrações de AR encontradas, tendo em vista a unidade utilizada para expressá-las (mg/L), são devidas à diluição dos licores obtidos a partir do pré-tratamento alcalino. Muito embora a lignina e compostos derivados solúveis nessas frações tenham sido precipitados com emprego de HCl, sabe-se acerca do poder de inibição que esses compostos apresentam sobre atividades microbianas e enzimáticas. Dessa forma, optou-se por realizar tal diluição e investigar a influência dos licores no crescimento de *A. niger* e indução de enzimas carboidrases.

4.5 PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Aspergillus niger* CULTIVADO EM BAGAÇO DE MAÇÃ E UVA PRÉ-TRATADOS DISPERSOS EM MEIO MÍNIMO

A fim de entender a contribuição dos sólidos pré-tratados para indução da atividade enzimática de *A. niger*, um segundo conjunto de fermentações foi conduzido. Dessa forma, 0,5 gramas de BMT ou BUT foram adicionados a 100 mL do meio mínimo preparado. Os frascos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e agitação empregadas no primeiro conjunto de fermentações. O perfil de atividade de celulasas obtido para esse cultivo está apresentado no Gráfico 6.

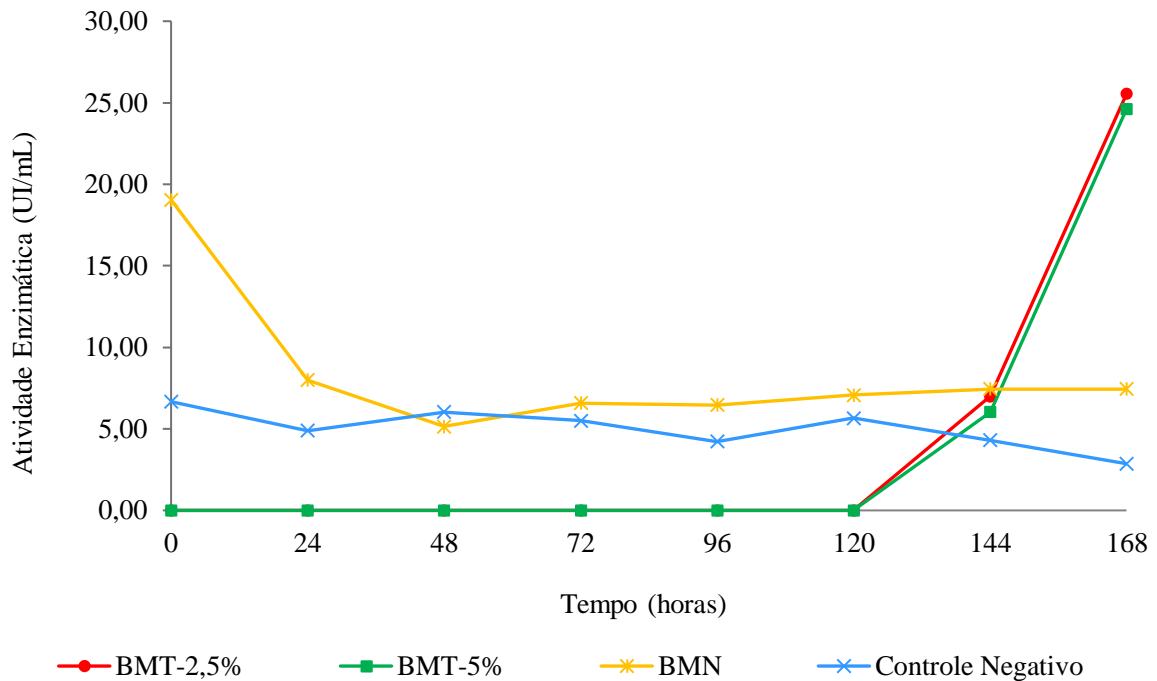
A partir do Gráfico 6, observa-se o mesmo comportamento evidenciado anteriormente para o bagaço de maçã *in natura*. O tratamento demonstrou alta atividade enzimática no momento da inoculação dos esporos, o que pode estar atrelado ao método empregado para mensuração da produção de enzimas. A partir do segundo dia de cultivo, a atividade enzimática de *A. niger* em BMN e controle negativo apresentou certa estabilidade, desempenho que se manteve até o final do cultivo.

Adicionalmente, o Gráfico 6 ilustra um perfil de desempenho bastante interessante. A produção de celulasas nas fermentações submersas de BMT-2,5% e BMT-5% apresentou expressivo aumento somente a partir das 120 horas de cultivo, totalizando 25,54 UI/mL e 24,61 UI/mL de CMCases em 168 horas, para BMT-2,5% e BMT-5%, respectivamente.

De acordo com Dhillon *et al* (2012), a ausência de glicose no meio estimula, inicialmente, a produção de celulasas em baixas concentrações, as quais são suficientes para degradar a celulose em moléculas menores e induzir fungos filamentosos à secreção de maiores concentrações de complexos enzimáticos. Das *et al* (2013) também demonstraram que a

presença de glicose no meio reprime a síntese de enzimas carboidrases, enquanto que a presença de produtos de degradação da celulose parece estimular a expressão de altos níveis de celulases.

Gráfico 6 - Atividade de CMCase em meio mínimo contendo sólidos (BMT) derivados do bagaço de maçã

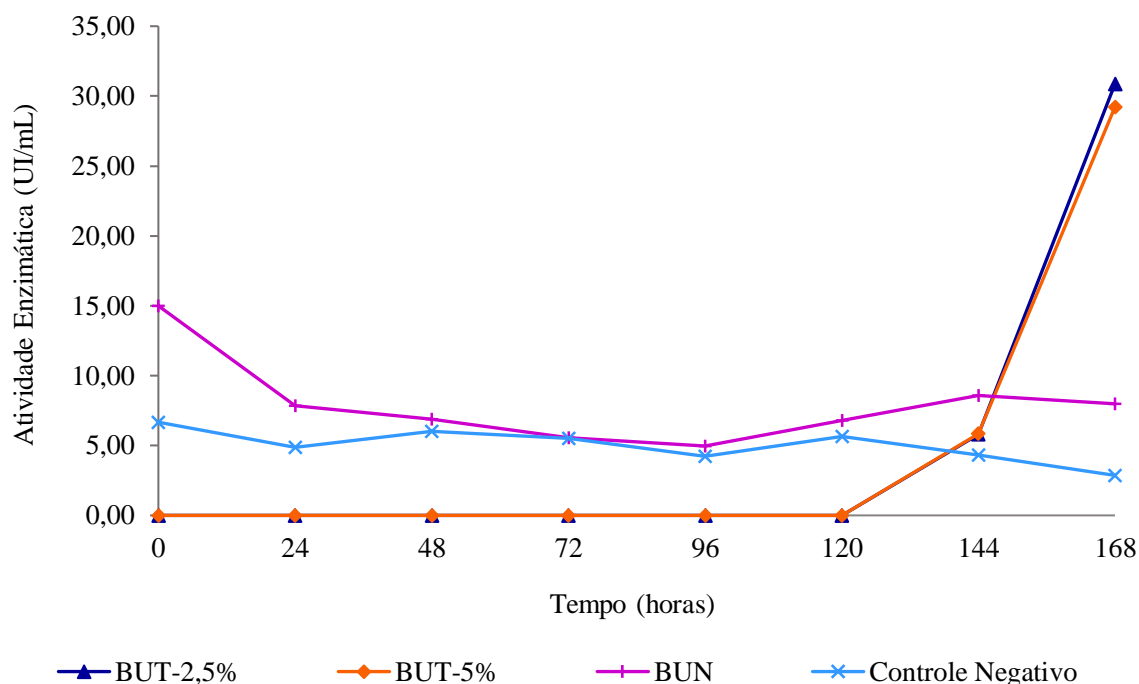


Fonte: Autora (2022).

Assim, ao longo dos cinco primeiros dias de fermentação, é possível que outras enzimas carboidrases secretadas por *A. niger* (não quantificadas nesse trabalho) tenham iniciado a hidrólise dos carboidratos presentes nos sólidos de BMT-2,5% e BMT-5%. Essa catálise inicial abriu caminhos para a ação das celulases, induzidas a partir do quinto dia de fermentação submersa. O perfil ascendente visto ao final das curvas no Gráfico 6 indica a possibilidade de atividades ainda maiores nos dias seguintes de incubação, mesmo que a atividade de CMCases tenha sido quantificada apenas até o sétimo dia de cultivo.

O Gráfico 7 apresenta o perfil de produção de enzimas celulases a partir de bagaço de uva pré-tratado.

Gráfico 7 - Atividade de CMCase em meio mínimo contendo sólidos (BUT) derivados do bagaço de uva

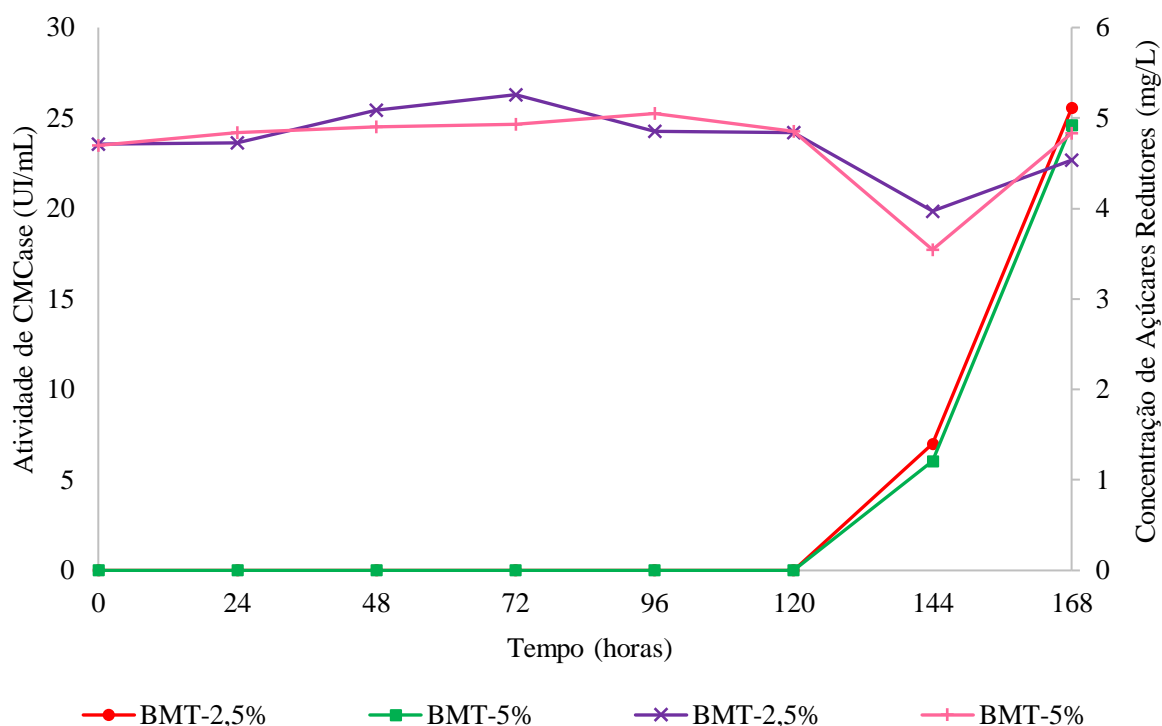


Fonte: Autora (2022).

De forma bastante semelhante aos resultados para o bagaço de maçã, os cultivos conduzidos com BUT-2,5% e BUT-5% exibiram alta atividade de celulases nos dois últimos dias de fermentação submersa (Gráfico 7). Nesse caso, níveis ainda mais altos foram atingidos, somando 30,87 UI/mL e 29,22 UI/mL de CMCases para BUT-2,5% e BUT-5%, respectivamente. Especula-se que os resultados obtidos sejam fruto da atividade sinérgica de diversas enzimas envolvidas na catálise de carboidratos em biomassas lignocelulósicas, que culminaram na indução de celulases, quantificadas nesse trabalho.

Ao passo que a atividade enzimática se mostrou expressiva, a sacarificação dos bagaços pré-tratados deveria revelar elevada concentração de AR, contudo a quantificação desse componente não apontou tal correlação. Os Gráficos 8 e 9 demonstram os perfis de atividade de celulases e a variação da concentração de AR livre no meio.

Gráfico 8 - Perfil de atividade de CMCase e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de maçã pré-tratado (BMT)



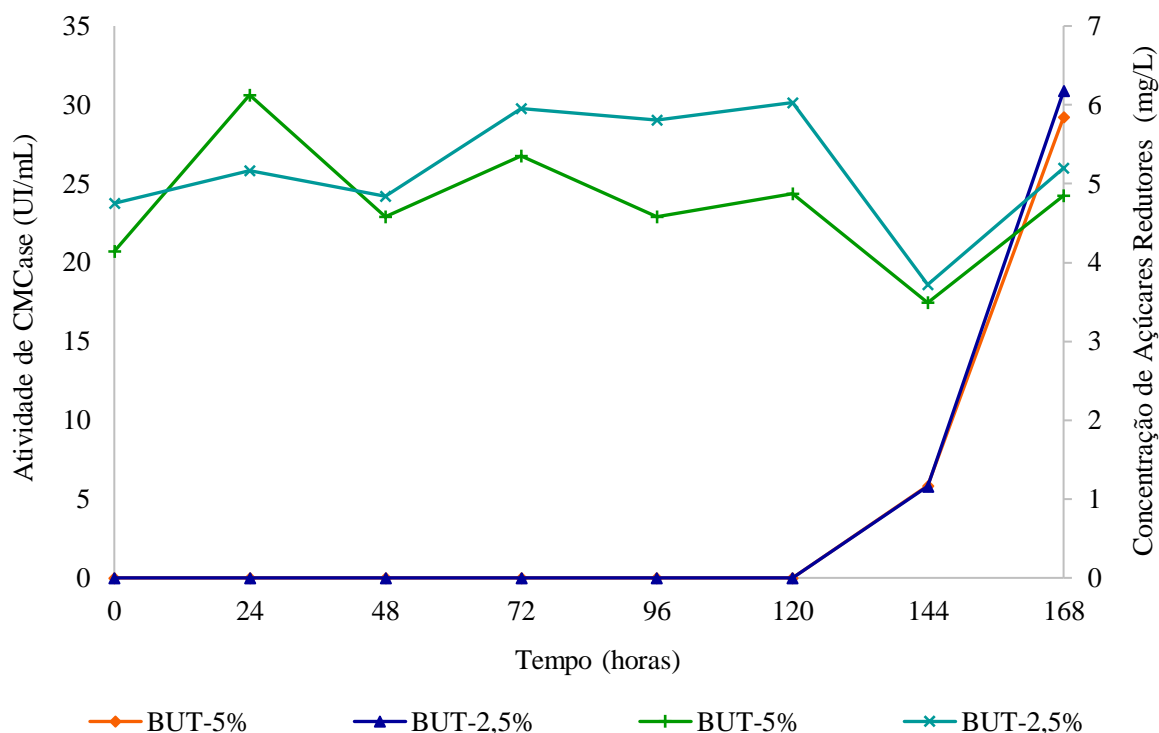
Fonte: Autora (2022).

A partir do Gráfico 8, observa-se que a concentração de AR ao longo do cultivo submerso com BMT se mostrou estável até o quinto dia de incubação, acompanhando a estabilidade na atividade das celulases. Após esse momento, houve redução da concentração desse substrato, no sexto dia, ao passo que houve drástica elevação na produção de CMCases, cuja atividade resultou em retorno da concentração de AR a níveis semelhantes aos quantificados no início da fermentação, 4,54 mg/L para BMT-2,5% e 4,83 mg/L para BMT-5%, quantificados no sexto dia de fermentação.

A performance da sacarificação nesse caso não se mostrou tão efetiva quando comparada aos resultados dos cultivos com bagaços enriquecidos com licor. Acredita-se que o perfil ascendente da atividade de celulases visto para os últimos dias de cultivo refletiria em alta conversão dos carboidratos presentes em BMT, com aumento da concentração de AR no meio, caso a fermentação fosse conduzida por mais dias.

Desempenho semelhante está ilustrado no Gráfico 9, para BUT. Nesse caso, mesmo sem atividade de CMCase, houve variação na concentração de AR livre ao longo dos cinco primeiros dias de fermentação.

Gráfico 9 - Perfil de atividade de CMCase e variação na concentração de AR ao longo do cultivo com bagaço de uva pré-tratado (BUT)



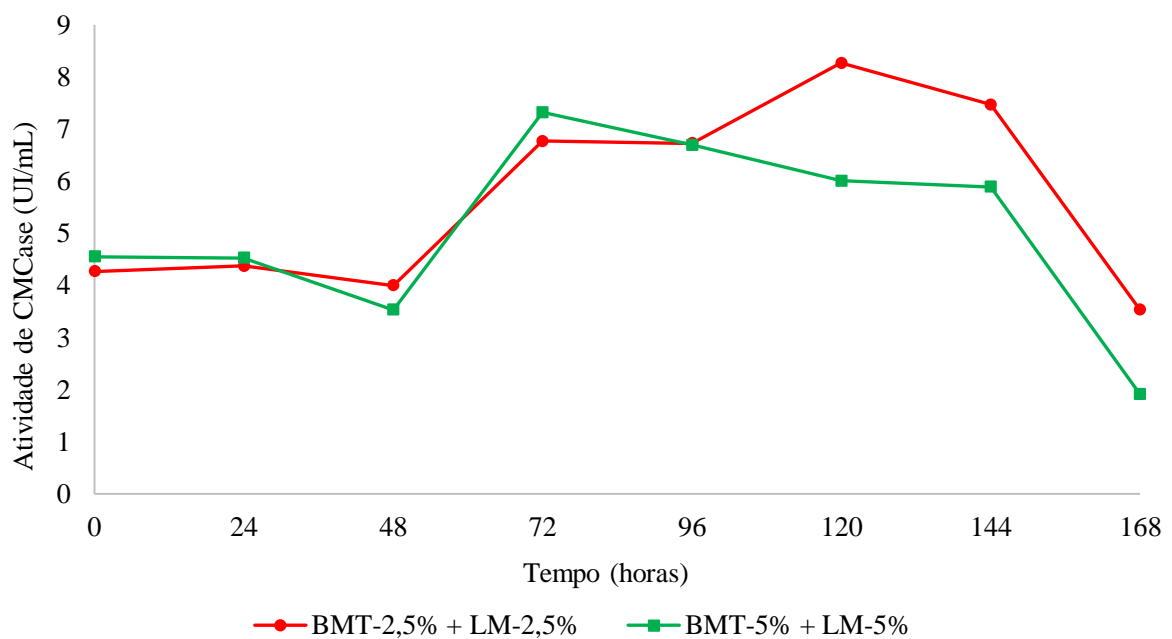
Fonte: Autora (2022).

Da mesma forma, os últimos dois dias de cultivo foram caracterizados por decréscimo, seguido de aumento na concentração desse substrato, provável resultado da atividade de celulases secretadas por *A. niger*. Silva (2018) investigou a produção de holocelulases por *Aspergillus niger* DCFS11 empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente como fonte de carbono. Essa biomassa induziu 0,211 UI/mL de CMCase, atividade superior ao encontrado com bagaço *in natura* (0,066 UI/mL), mas que não alcançou o nível de celulases induzidas no cultivo do bagaço pré-tratado enriquecido com licor obtido do mesmo pré-tratamento, o qual atingiu 0,225 UI/mL. O tempo de cultivo, nesse caso, foi de apenas cinco dias.

4.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO NO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO SOBRE O PERFIL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Aspergillus niger*

Como forma de reduzir a recalcitrância das biomassas empregadas nesse trabalho, foi realizado pré-tratamento alcalino, explorando duas concentrações distintas de hidróxido de sódio, 2,5% (m/v) e 5% (m/v). Os Gráficos 10 e 11 ilustram o perfil de atividade enzimática obtido para os cultivos com BMT enriquecido com LMT e BUT enriquecido com LU, respectivamente.

Gráfico 10 - Influência do pré-tratamento alcalino no perfil de atividade enzimática para BMT

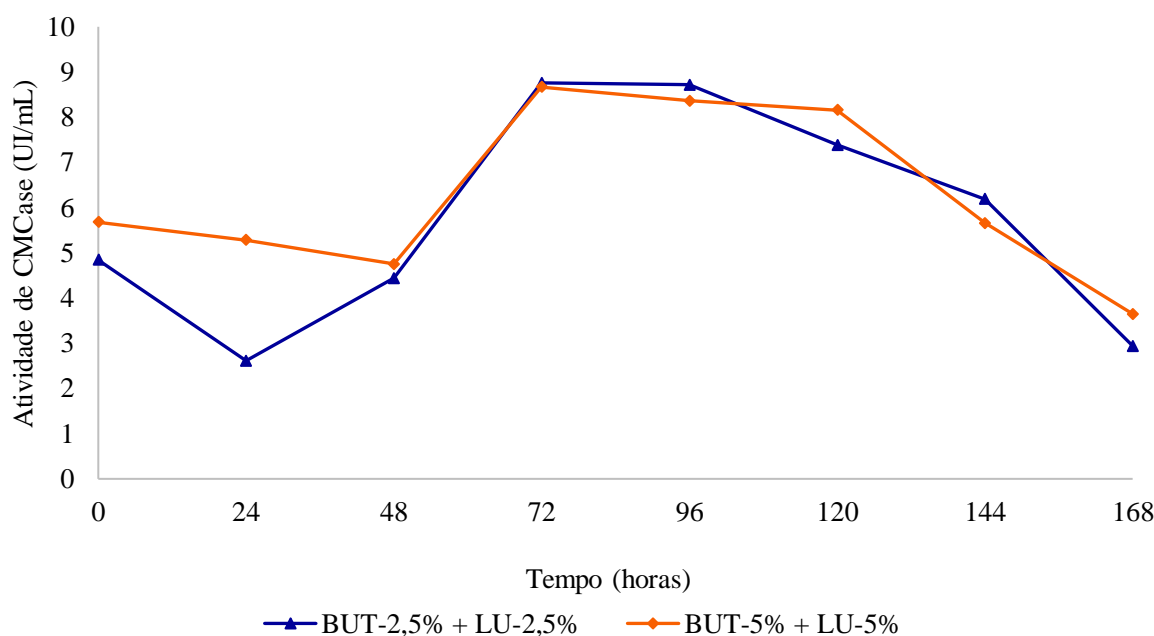


Fonte: Autora (2022).

A partir do Gráfico 10, observam-se diferenças no perfil enzimático dos tratamentos ao longo do cultivo submerso. Ao longo das primeiras 24 horas, o tratamento mais severo mostrou maior atividade de celulasas, apresentando decréscimo em 48 horas de cultivo. Um primeiro pico de produção de celulasas ocorreu para ambos os tratamentos em 72 horas de cultivo, apontando BMT-5% + LM-5% como melhor condição para indução de celulasas. Entretanto, em 120 horas, o tratamento mais brando, BMT-2,5% + LM-2,5%, apresentou segundo pico de atividade de celulasas, disparando para 8,27 UI/mL.

Os resultados apontam que a utilização de menores concentrações de NaOH, possibilitam maior indução de enzimas CMCase. Tendo em vista que o emprego de hidróxido de sódio tem ação sobre as ligações aril-éter e aril-alkil-éter da molécula de lignina, o uso de soluções mais concentradas acarretam em maior degradação e maior concentração de fenólicos derivados da lignina (LADEIRA-ÁZAR *et al.*, 2019). Os menores rendimentos enzimáticos encontrados para os cultivos com BMT-5% + LM-5% podem estar atrelados a uma maior concentração de fenólicos no licor, que impediu a atividade das CMCases induzidas.

Gráfico 11 - Influência do pré-tratamento alcalino no perfil de atividade enzimática para BUT



Fonte: Autora (2022).

O Gráfico 11 ilustra o perfil de atividade enzimática obtido para os cultivos com BUT enriquecido com LUT. Diferentemente da performance utilizando BMT como fonte de carbono, as diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de uva não refletiram em diferenças significativas para a indução de CMCase. Do ponto de vista econômico, menores concentrações de catalisadores refletem em menores custos de produção, sendo mais viável optar pelo pré-tratamento com NaOH a 2,5% (m/v). Entretanto, resultados supracitados (Gráfico 5) demonstram que o tratamento mais severo refletiu em rendimento de AR 7,5% superior ao tratamento cuja solução de hidróxido de sódio foi mais concentrada.

4.7 PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE CELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger*

A Tabela 5 contém os resultados encontrados para a atividade específica das CMCase produzidas por *A. niger* em 72 horas de cultivo sobre sólidos tratados e enriquecidos com licor. A atividade específica de uma enzima se refere à atividade catalítica por unidade de peso de proteína (ADOLPH; LORENZ, 1980), parâmetro bastante importante para a avaliação de enzimas secretadas. De acordo com Gomes (2014), enzimas que exibem alta atividade específica apresentam facilidades durante o processo de purificação.

Tabela 5 - Atividade específica de celulasas induzidas por sólidos enriquecidos com licor

Cultivo	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade específica (UI/mg)
BMT-2,5% + LM-2,5%	0,70	9,74
BMT-5% + LM-5%	0,64	11,39
BUT-2,5% + LU-2,5%	1,12	7,81
BUT-5% + LU-5%	1,49	5,82

Fonte: Autora (2022).

De acordo com a Tabela 5, embora os tratamentos conduzidos com BUT + LU tenham induzido maiores atividades de CMCase, também acarretaram maior produção de proteínas. Dessa forma, houve redução da atividade específica das enzimas secretadas nesse caso, ao contrário da performance vista para os cultivos contendo BMT + LM, que apresentaram aproximadamente o dobro do valor obtido para BUT, quando tratados com NaOH 5%.

Os resultados de atividade específica em 168 horas para a segunda estratégia de cultivo estão presentes na Tabela 6. Como pode ser visto, a atividade específica das CMCase induzidas no cultivo sobre os bagaços pré-tratados foi largamente expressiva, devido à baixa concentração de proteínas presentes nos cultivos.

Tabela 6 - Atividade específica de celulases induzidas por sólidos tratados

Cultivo	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade específica (UI/mg)
BMT-2,5%	0,10	248,37
BMT-5%	0,11	221,03
BUT-2,5%	0,13	246,31
BUT-5%	0,12	251,46

Fonte: Autora (2022).

4.8 ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO TOTAL DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As celulases ocupam, atualmente, a terceira colocação no ranking de enzimas mais utilizadas industrialmente, devido a sua vasta gama de aplicações. Um grande gargalo econômico da produção de etanol de segunda geração é a etapa de hidrólise enzimática, que explora a atividade catalítica de celulases produzidas via fermentação submersa, processo de maior custo em comparação ao cultivo em estado sólido. De acordo com estimativas reportadas na literatura, o custo de produção de celulases por fermentação submersa é 10 vezes maior quando comparado ao processo em ausência de água, devido aos processos *downstream* de concentração e purificação necessários (SRIVASTAVA *et al.*, 2021).

Tendo em vista a máxima atividade de celulases encontrada para ambos os bagaços nas duas configurações de cultivo utilizadas nesse trabalho, construiu-se a Tabela 7.

Tabela 7 - Estimativa da produção total de CMCases a partir dos bagaços de maçã e uva

Cultivo	Montante de resíduos na safra 2019 (kg)	UI/mL	UI/g	UI totais
BMT + LM	9,00 x 10 ⁷	7,4	14,8	5,33 x 10 ¹¹
BMT		25,53	51,06	1,84 x 10 ¹²
BUT + LU	1,40 x 10 ⁸	8,7	17,4	9,74 x 10 ¹¹
BUT		30,87	61,74	3,46 x 10 ¹²

Fonte: Autora (2022).

A Tabela 7 estima o máximo rendimento de CMCases, caso o montante total de resíduos reportados em 2019 fosse destinado à produção de enzimas. Considerando que a partir de 10 gramas de biomassa *in natura*, foram obtidos, em média, 2 gramas de bagaço pré-tratado, estimam-se rendimentos de mais de 500 e 900 bilhões de UI de celulases a partir de bagaço pré-tratado de maçã e uva como fonte de carbono, respectivamente. As atividades de celulases utilizadas correspondem aos maiores picos atingidos para ambas as biomassas, quando enriquecidas com licor. Caso fossem empregados somente os sólidos pré-tratados, seria possível triplicar o rendimento, independente do bagaço utilizado (Tabela 7).

Tais números revelam o potencial de produção de enzimas CMCases a partir de resíduos agroindustriais largamente produzidos em regiões como a Serra Gaúcha. Vale ressaltar a importância de uma análise técnico-econômica do processo, de forma a avaliar custos e tempos de produção, apontando a viabilidade com integridade e os impactos nos custos finais. Assim, seria possível assegurar sobre a contribuição dos bagaços de maçã e uva para barateamento da produção de enzimas.

5 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento desse trabalho, é possível concluir que os bagaços de uva e maçã têm potencial para serem explorados, em vistas a produção de compostos de valor agregado, como etanol de segunda geração e lignina, desde que submetidos à pré-tratamentos para redução da complexidade da matriz lignocelulósica.

Os resultados demonstram que a aplicação do pré-tratamento alcalino é efetiva na remoção da lignina dos tecidos utilizados. Soluções de hidróxido de sódio menos concentradas (2,5% (m/v)) parecem provocar maior degradação da lignina, de acordo com as estimativas realizadas nesse trabalho. Para conclusões mais concentradas acerca do potencial de remoção, deve ser conduzida uma segunda caracterização físico-química dos resíduos após o tratamento.

A diferença de concentração de NaOH não foi diretamente proporcional à recuperação da lignina. Os resultados encontrados apontam que foi possível precipitar maior concentração de lignina quando soluções menos concentradas de NaOH foram utilizadas, cuja demanda de HCl foi menor. Em comparação, é possível dizer que seriam necessários menores custos com catalisadores ácidos e básicos para esta operação.

O pré-tratamento alcalino também demonstrou maior recuperação de açúcares, quando aplicado ao bagaço de uva pré-tratado, independente da concentração de NaOH. Esse resultado pode ser reflexo da maior atividade de CMCase evidenciada para os tratamentos com bagaço de uva pré-tratado (BUT), tanto na ausência quanto na presença do licor (LU), o que refletiu também em maior poder de sacarificação dos sólidos.

A morfologia de crescimento de *A. niger* se mostrou correlacionada à atividade de CMCase. Os cultivos que demonstraram maior atividade de enzimas celulases, também apresentaram maior dispersão do fungo ao longo do seu crescimento, com formação de pellets menores e mais numerosos.

Ficou constatado que os licores obtidos do pré-tratamento alcalino aceleram a indução de CMCase, independente do tratamento e resíduo utilizado. Os picos para atividade enzimática e concentração de AR no meio revelam que o tempo ideal para os cultivos sobre bagaços tratados enriquecidos com licor varia de 72 a 96 horas. Por outro lado, o perfil evidenciado para os cultivos contendo somente sólidos tratados, embora revelem o potencial dessas biomassas, demonstram o longo tempo necessário para a indução de enzimas. Esses

resultados indicam que essa configuração de cultivo é inviável do ponto de vista econômico, já que seria necessário manter as condições de temperatura e agitação utilizadas por muitos dias.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para esse trabalho podem-se citar:

- Caracterizar os bagaços de maçã e uva após o tratamento alcalino, para evidenciar a correta remoção da lignina;
- Verificar a aplicabilidade de métodos de pré-tratamento combinados, que empreguem menores volumes de soluções e, dessa forma, resultem em menor geração de efluentes líquidos;
- Investigar o potencial de menores concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) sobre os resíduos, em vistas a entender a menor e melhor concentração do catalisador, que otimize a etapa de pré-tratamento;
- Estudar o crescimento e monitorar as variações morfológicas de *Aspergillus niger* sobre diferentes concentrações do licor resultante do pré-tratamento alcalino, após precipitação ácida, de forma a disponibilizar maiores concentrações de açúcares, inicialmente, evitando que inibidores interfiram nas atividades microbianas e enzimáticas;
- Investigar o perfil de atividade enzimática de *A. niger* cultivado sobre os bagaços pré-tratados na ausência de licor, em vistas a encurtar o tempo para a indução de CMCases e obter maior rendimento em açúcares, na etapa de sacarificação;
- Testar o crescimento e o perfil de atividade enzimática de *A. niger* sobre bagaços de maçã e uva pré-tratados em fermentação em estado sólido;
- Levantar a viabilidade técnico-econômica de produção de CMCases a partir dos bagaços de maçã e uva, avaliar custos de produção e confrontando-os com reportes da literatura.

REFERÊNCIAS

- ABO, Bodjui Olivier *et al.* Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. **Reviews on Environmental Health**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 57–68, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>
- ADOLPH, Leo; LORENZ, Rita. Diagnóstico enzimático en las enfermedades de corazón, hígado y páncreas. [s. l.], p. 29–50, 1980. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Home/218740>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- ANUKAM, Anthony; BERGHEL, Jonas. Biomass Pretreatment and Characterization: A Review. *In*: BASSO, Thalita Peixoto (org.). **Biotechnological Applications of Biomass**. [S. l.]: IntechOpen, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.89320>
- ARSHAD, Muhammad *et al.* An Overview of Biofuels. *In*: ARSHAD, Muhammad (org.). **Perspectives on Water Usage for Biofuels Production**. [S. l.: s. n.], 2018. p. 1–37. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66408-8>
- ASA, Instrumentos de Medição. **REF32 REFRA TÔMETRO ANALÓGICO (0 A 32% BRIX)**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.asainstrumento.com.br/laboratorio-controle-de-qualidade/refratometros/refratometro-analogico-0-a-32-brix-ref32>. Acesso em: 15 maio 2022.
- BAJPAI, Pratima. **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4324/9780429346644-1>
- BRASIL. **LEI Nº 13.576, DE 26 DE DEZEMBRO DE 2017**. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Brasília: Presidente da República, 2017. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/113576.htm. Acesso em: 10 dez. 2021.
- BUFFO, Mariane M. *et al.* Relation between pellet fragmentation kinetics and cellulolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in conventional bioreactor with different impellers. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 139, n. April, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109587>
- BUNDHOO, Zumar M.A.; MOHEE, Romeela. Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 40, p. 298–313, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.025>
- CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **PIB DO AGRONEGÓCIO AVANÇA NO TRIMESTRE E ACUMULA ALTA DE 9,81% NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2021**. [s. l.], 2021. Disponível em: [https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_PIB_CNA_1semestre_21\(2\).pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_PIB_CNA_1semestre_21(2).pdf). Acesso em: 7 nov. 2021.
- CROSATTI, Beatriz Cristina Barbosa. **Produção De Etanol De Segunda Geração a Partir De Embalagem Cartonada Longa Vida**. [s. l.], 2017. Disponível em:

http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/8672/1/PG_COENQ_2017_1_04.pdf

CZAMANSKI, Raquel Teresinha. **PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM RESÍDUOS DA VITICULTURA NA PERSPECTIVA DA DESINFECÇÃO E ANTISSEPSE APLICADAS À SAÚDE E À PRODUÇÃO ANIMAL, BEM COMO À AGROINDÚSTRIA FAMILIAR**. 191 f. 2013. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/79477/000901694.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 7 nov. 2021.

DA SILVA, Ayla Santana *et al.* Productive Chain of Biofuels and Industrial Biocatalysis: Two Important Opportunities for Brazilian Sustainable Development. *In*: **BIOTECHNOLOGY OF MICROBIAL ENZYMES: PRODUCTION, BIOCATALYSIS AND INDUSTRIAL APPLICATIONS**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 545–581. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00020-0>

DAS, Arpan *et al.* Study on regulation of growth and biosynthesis of cellulolytic enzymes from newly isolated aspergillus fumigatus ABK9. **Polish Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 31–43, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.33073/pjm-2013-004>

DHILLON, Gurpreet Singh *et al.* Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 6–13, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.036>

FANG, Jiachen *et al.* Effects of apple pomace-mixed silage on growth performance and meat quality in finishing pigs. **Animal Science Journal**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. 1516–1521, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.12601>

FGV, Energia. Biocombustíveis. [s. l.], v. 4, n. 8, 2017. Disponível em: https://fgvenergia.fgv.br/sites/fgvenergia.fgv.br/files/caderno_biocombustivel_-_baixa.pdf. Acesso em: 7 nov. 2021.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, Enrique *et al.* Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, [s. l.], v. 196, p. 32–35, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.080>

GUIMARÃES, José Renato. **Produção De Bioetanol Por Co-Cultivo De Fungos**. 57 f. 2016. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2016.

GUSTAFSSON, Jesper *et al.* Development of bio-based films and 3D objects from apple pomace. **Polymers**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym11020289>

HASSAN, Shady S.; WILLIAMS, Gwilym A.; JAISWAL, Amit K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 262, n. April, p. 310–318, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>

HEMANSI *et al.* **Comparative study of cellulase production using submerged and solid-state fermentation.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00007-2>

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, Javier Ulises *et al.* Insight into pretreatment methods of lignocellulosic. **Applied Sciences**, [s. l.], 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola - Lavoura Permanente.** [S. l.], 2019.

IZMIRLIOGLU, Gulden; DEMIRCI, Ali. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. **Fuel**, [s. l.], v. 185, p. 684–691, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.035>

JIN, Qing *et al.* An Integrated Approach for the Valorization of Red Grape Pomace: Production of Oil, Polyphenols, and Acetone-Butanol-Ethanol (ABE). **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 16279–16286, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03136>

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>

JÚNIOR, Eraldo Antonio Bonfatti. **QUALIDADE DA LIGNINA KRAFT EM FUNÇÃO DO AGENTE PROTONADOR.** 115 f. 2020. Tese (Doutorado) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

KING, Brian C. *et al.* An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 1033–1044, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.22151>

KIST, Benno Bernardo *et al.* **Anuário Brasileiro da Maçã 2019.** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019.

KIST, Benno Bernardo *et al.* **Anuário Brasileiro de Horti&Fruti 2021.** Santa Cruz do Sul: [s. n.], 2021. Disponível em: https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf.

LADEIRA-ÁZAR, Rafaela I.S. *et al.* Inhibitors Compounds on Sugarcane Bagasse Saccharification: Effects of Pretreatment Methods and Alternatives to Decrease Inhibition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 188, n. 1, p. 29–42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2900-6>

LIMA, Mary Anne S. *et al.* *Aspergillus Niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 2029–2059, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190080>

LOSEKANN, Luciano; HALLACK, Michelle. Novas energias renováveis no Brasil: desafios

e oportunidades. **Desafios da nação: artigos de apoio**, [s. l.], v. Volume 2, p. 678, 2018.

MAENPUEN, Somchart *et al.* Production of valuable phenolic compounds from lignin by biocatalysis: State-of-the-art perspective. *In*: CHANG, Ho Nam (org.). **Emerging Areas in Bioengineering**. [S. l.]: Wiley-VCH, 2017. p. 105–123. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527803293.ch7>

MAGALHÃES, Antonio Irineudo *et al.* Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1505–1519, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.2048>

MARRIOTT, Poppy E.; GÓMEZ, Leonardo D.; MCQUEEN-MASON, Simon J. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. **New Phytologist**, [s. l.], v. 209, n. 4, p. 1366–1381, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.13684>

MATIELLO, Julia Maria; WICPOLT, Nathalia dos Santos; GAVA, Aldo. Uso de bagaço de maçã na alimentação de vacas gestantes e sua possível relação com nascimento de bezerros com artrogrípse e nanismo. [s. l.], p. 2016, 2016.

MELLO, Loiva Maria Ribeiro de; MACHADO, Carlos Alberto Ely. **Vitivinicultura brasileira : Panorama 2019**. Bento Gonçalves: [s. n.], 2020. Disponível em: [//www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1124189](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1124189). Acesso em: 7 nov. 2021.

MELLO, Loiva Maria Ribeiro; SILVA, Gildo Almeida. **Disponibilidade e Características de Resíduos Provenientes da Agroindústria de Processamento de Uva do Rio Grande do Sul**. [S. l.: s. n.], 2014.

MELO, Marcelo Caetano. **Políticas Públicas Brasileiras de Biocombustíveis: estudo comparativo entre os programas de incentivos à produção, com ênfase em etanol e biodiesel**. 86 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1172>

MELO, Nicholas Rocha. **ETANOL 2G: PROCESSO PRODUTIVO E SEU CONTEXTO ATUAL NO BRASIL**. 53 f. 2020. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

MUSTAFA, Ahmed M.; POULSEN, Tjalfe G.; SHENG, Kuichuan. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. **Applied Energy**, [s. l.], v. 180, p. 661–671, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.135>

MUTHUVELU, Kirupa Sankar *et al.* Evaluation and characterization of novel sources of sustainable lignocellulosic residues for bioethanol production using ultrasound-assisted alkaline pre-treatment. **Waste Management**, [s. l.], v. 87, p. 368–374, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.02.015>

NANDA, Sonil; VO, Dai Viet N.; SARANGI, Prakash Kumar. **Biorefinery of alternative resources: Targeting green fuels and platform chemicals**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível

em: <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1804-1>

NOSRATPOUR, Mohammad Javad; KARIMI, Keikhosro; SADEGHI, Morteza. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 226, n. August, p. 329–339, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.058>

OH, You Kwan *et al.* Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 257, n. December 2017, p. 320–333, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.089>

PASIN, Thiago Machado *et al.* Bioconversion of Agro-industrial Residues to Second-Generation Bioethanol. In: NANDA, Sonil; VO, Dai-Viet N.; SARANGI, Prakash Kumar (org.). **Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals**. Singapura: Springer, 2020. p. 503.

PATHANIA, Shruti; SHARMA, Nivedita; HANDA, Shweta. Utilization of horticultural waste (Apple Pomace) for multiple carbohydrase production from *Rhizopus delemar* F2 under solid state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 181–189, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.013>

PROZ, Mariel de los Ángeles. **Estudo de caso envolvendo a valorização de subprodutos do processamento do suco de maçã**. 59 f. 2017. Monografia (Diplomação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

QU, Tianjiao *et al.* Ball Milling for Biomass Fractionation and Pretreatment with Aqueous Hydroxide Solutions. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 7733–7742, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01186>

RAVINDRAN, Rajeev; JAISWAL, Amit Kumar. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 92–102, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>

RODRIGUES, Jose Augusto R. Do engenho a biorrefinaria. A usina de acucar como empreendimento industrial para a geracao de produtos bioquimicos e biocombustiveis. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1242–1254, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700024>

ROMO SÁNCHEZ, Sheila *et al.* Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 587–593, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1298-y>

SCHUSTER, E. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

SHARMA, Bhawna; LARROCHE, Christian; DUSSAP, Claude Gilles. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 313, n. May, p.

123630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>

SILVA, Caio De Oliveira Gorgulho. **Tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para aumentar a produção de holocelulases por *Aspergillus niger***. 192 f. 2018. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas) - Departamento e Biologia Celular - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SILVA, Caio de Oliveira Gorgulho; FILHO, Edivaldo Ximenes Ferreira. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 592–602, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9815-x>

SILVEIRA, Márcia Adriana Gomes da *et al.* A sustentabilidade do destino do bagaço da vinificação no Brasil. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e247997197, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7197>

SINGH, Arshdeep; NANDA, Sonil; BERRUTI, Franco. A Review of Thermochemical and Biochemical Conversion of Miscanthus to Biofuels. *In*: NANDA, Sonil; VO, Dai-Viet N.; SARANGI, Prakash Kumar (org.). **Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals**. Singapura: Springer, 2020. p. 503.

SRIVASTAVA, Neha *et al.* Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: A review. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 287, n. May, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117370>

VASCONSELOS, Natália Moura de; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; ARAGÃO, Fernando Antônio de Souza. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. 1 eded. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. ISSN 1678-0892. *E-book*.

WATERBORG, J. H. The Lowry method for protein quantitation. *In*: WALKER, John M. (org.). **The Protein Protocols Handbook**. 3. ed. Nova Jersey: Humana Totowa, 2009. p. 7–10. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7>

ZHANG, Zhanying *et al.* Biofuels from food processing wastes. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 38, p. 97–105, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.010>

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 465–482, 2012a. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bbb.1331>

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 561–579, 2012b. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bbb.1350>