

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES JEQUITINHONHA E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

BEATRIZ VIEIRA DOS SANTOS

**Caracterização, pré-tratamentos, hidrólises enzimáticas e fermentação
alcoólica de sorgo biomassa [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]**

UBERLÂNDIA

2019

BEATRIZ VIEIRA DOS SANTOS

**Caracterização, pré-tratamentos, hidrólises enzimáticas e fermentação
alcoólica de sorgo biomassa [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências e Tecnologia de Biocombustíveis

Área de concentração: Biomassas energéticas: ciência e tecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Milla Alves Baffi
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Pasquini

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S237 Santos, Beatriz Vieira dos, 1974-
2019 Caracterização, pré-tratamentos, hidrólises enzimáticas e
fermentação alcoólica de sorgo biomassa [*Sorghum bicolor*
(L.) Moench] [recurso eletrônico] / Beatriz Vieira dos Santos. -
2019.

Orientadora: Milla Alves Baffi.

Coorientadora: Daniel Pasquini.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,

Pós-graduação em Biocombustíveis.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te>.

2019.2023

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biocombustível. I. Alves Baffi, Milla , 1977-, (Orient.). II.
Pasquini, Daniel, 1974-, (Coorient.). III. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. IV. [DOI:10.14393/ufu.te](https://doi.org/10.14393/ufu.te)

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Tese de Doutorado				
Data:	29 de abril de 2019	Hora de início:	15:10	Hora de encerramento:	18:40
Matrícula do Discente:	11513PGB001				
Nome do Discente:	Beatriz Vieira dos Santos				
Título do Trabalho:	Caracterização, pré-tratamentos, hidrólises enzimáticas e fermentação alcoólica de sorgo biomassa [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench]				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Biomassas energéticas: ciência e tecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	PRONEM FAPEMIG APQ-01360-14: Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioprodutos químicos de valor agregado.				

Reuniu-se no Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta: Professores Doutores: Reinaldo Ruggiero, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia; Reginaldo de Camargo, da(o) Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia; Bruno Eduardo Lobo Baêta, da(o) Universidade Federal de Minas Gerais; Leandro Vinícius Alves Gurgel, da(o) Universidade Federal de Ouro Preto; bem como Milla Alves Baffi, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Milla Alves Baffi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu a(o) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da(o) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Alves Baffi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/04/2019, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reginaldo de Camargo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/04/2019, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reinaldo Ruggiero, Membro de Comissão**, em 02/05/2019, às 08:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Vinícius Alves Gurgel, Usuário Externo**, em 02/05/2019, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Eduardo Lobo Baêta, Usuário Externo**, em 03/05/2019, às 22:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1135951** e o código CRC **68376863**.

Dedico esta tese a minha querida filha Maria Eduarda, ao meu esposo Eduardo e aos meus pais: Bolivar e Maria Concebida, por todo amor, carinho, compreensão e apoio destinados a mim durante a realização deste trabalho. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela saúde, força e sabedoria para que concluísse mais essa importante etapa da minha vida. Gratidão!

À minha família, em especial a minha filha, meu esposo, meus pais e minhas irmãs: Betânia, Bânia e Bruna pelo amor incondicional, paciência, atenção, ensinamentos, lições de vida e pela compreensão dos momentos que estive ausente. Sou grata a Deus pela família que tenho!

À minha orientadora, Profa. Dra. Milla Alves Baffi pela confiança, dedicação, pelas valiosas orientações acrescidas de atenção e apoio. Pelo incentivo e oportunidade da realização do Doutorado Sanduíche. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Dr. Daniel Pasquini pelas suas contribuições durante a execução do trabalho.

Aos professores: Prof. Dr. Reginaldo de Camargo, Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero, Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel e Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta por aceitarem o convite para participarem da banca avaliadora desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), hoje docente da Universidade Federal de Minas Gerais pelo fornecimento das amostras de sorgo biomassa para o desenvolvimento do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche.

A Profa. Dra. Silvia Bolado do Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid e Dr. Rodolfo Travaini, pela orientação e supervisão do projeto durante o Doutorado Sanduíche.

Ao Diretor do Instituto de Ciências Agrárias, Prof. Dr. Beno Wendling e demais membros do conselho do Instituto de Ciências Agrárias por ter aprovado e concedido a minha licença integral para cursar o Doutorado Sanduíche na Espanha.

Ao Prof. Dr. Lucas Carvalho Basilio de Azevedo pelo apoio destinado a realização desse trabalho.

Ao Dr. Diego Tolentino de Lima e seu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio pelo plantio e colheita do sorgo.

Aos colegas e amigos: Alina Curbelo, Nereida Pérez, Sarah Jane, Ricardo Sebastián, Leandro Ortunes, Michele Ortunes, Jocilia Cunha e Isadora Cunha por todo apoio durante a minha estadia na Espanha e por todos os bons momentos compartilhados.

As amigas e colegas de trabalho Dr. Julia Araújo de Lima, Ms. Márcia Regina Batistela e Ms. Yara Magalhães por todo apoio, incentivo e ajuda. Obrigada pelo carinho, saibam que é recíproco.

A todos os técnicos e docentes do Instituto de Ciências Agrárias, agradeço pelo apoio.

A doutoranda Patrícia de Oliveira Rodrigues, sempre presente e disposta a ajudar. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

As pessoas que por ventura não foram mencionadas aqui, mas que não deixaram de ser importantes nesta caminhada.

RESUMO

O sorgo biomassa (SB) é um tipo de sorgo sensível ao fotoperíodo com alta produtividade em biomassa e maior conteúdo em polissacarídeos (celulose e hemiceluloses), tornando-se uma cultura promissora para aplicação na produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). Neste contexto, na primeira etapa desse estudo, avaliou-se a eficiência de um extrato enzimático produzido por fermentação em estado sólido (FES) utilizando um consórcio entre os fungos *Aspergillus fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1 na hidrólise de SB bruto e após a retirada de extrativos (SE). Após a FES, com relação à produção de hemicelulases, foram obtidos picos máximos de xilanase (375 U g^{-1}) no 4º dia e β -xilosidase (150 U g^{-1}) no 2º dia de co-cultivo. Para celulases, os picos máximos de produção foram observados no 1º dia de fermentação (80 U g^{-1}) para β -glicosidase e no 6º dia (80 U g^{-1}) para endoglucanase (CMCase) e celulase em papel de filtro (FPase) (4 U g^{-1}). Após a hidrólise enzimática utilizando o extrato produzido pelo consórcio fúngico, a liberação de xilose e glicose aumentou em SE cerca de 10x ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$ após 12 horas), indicando que a retirada de extrativos influenciou positivamente na eficiência da hidrólise e nos rendimentos em açúcares fermentescíveis. A retirada dos extrativos também representou um fator positivo para a diminuição da formação de compostos inibidores da fermentação alcoólica, como o ácido fórmico. Na segunda etapa, foi avaliado o rendimento em etanol a partir de hidrolisados de sorgo biomassa previamente submetido a três diferentes pré-tratamentos químicos (PTs): hidróxido de sódio (NaOH - 1 e 2%), ácido clorídrico (HCl - 0,34 e 1,5%) e peróxido de hidrogênio alcalino (H_2O_2 - 5 e 7,36%) utilizando as enzimas comerciais Celluclast 1,5 L (10FPU) e Novozym 188 (30CBU) nas hidrólises e a levedura *Pichia stipitis* na fermentação alcoólica. Entre os PTs usados, o PT com H_2O_2 a 7,36% foi o mais eficiente na remoção de lignina e preservação da fração polissacarídica. Após as hidrólises, observou-se que as concentrações de xilose se mantiveram praticamente inalteradas nos hidrolisados de SB "in natura" e SE (sem extrativos). No entanto, nos hidrolisados de sorgo pré-tratado, observou-se um grande aumento na concentração de xilose, principalmente nos hidrolisados de sorgo pré-tratado com HCl e H_2O_2 . Esse aumento foi ainda mais expressivo nos hidrolisados de sorgo pré-tratado com HCl 0,34% e com H_2O_2 5%. Com relação à glicose, a amostra de sorgo pré-tratado com H_2O_2 foi o que favoreceu a maior liberação desse monossacarídeo após a hidrólise enzimática. Além disso, todos os hidrolisados apresentaram baixas concentrações de inibidores. Após as hidrólises, os maiores rendimentos em etanol foram obtidos nas fermentações com os hidrolisados de SB pré-tratado com HCl (0,34 e 1,5%), obtendo-se $3,84$ e $3,61 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, correspondendo respectivamente a 16,15 e 14,62% de rendimento. Os resultados obtidos

indicaram que o sorgo biomassa apresenta potencial para utilização como matéria prima na produção de etanol e abrem perspectivas para estudos adicionais a fim de otimizar o processo e obter rendimentos ainda mais expressivos em etanol.

Palavras-chave: Culturas energéticas. Consórcio enzimático. Materiais lignocelulósicos. Bioetanol.

ABSTRACT

Sorghum biomass (SB) is a kind of sorghum sensitive to photoperiod with high productivity in biomass, and higher content in polysaccharides (cellulose and hemicelluloses), becoming a promising crop for application in the production of second generation ethanol (2G ethanol). In this context, in the first stage of this study, the efficiency of an enzymatic extract produced by solid state fermentation (SSF) was evaluated using a consortium between the fungi *Aspergillus fumigatus* SCBM6 and *A. niger* SCBM1 in the hydrolysis of crude SB and after the removal of extractives (SE). After SSF, with respect to hemicellulase production, maximum peaks of xylanase (375 U g⁻¹) on day 4 and β -xylosidase (150 U g⁻¹) were obtained on 2nd day of co-cultivation. For cellulases, peaks of production were observed on the 1st day of fermentation (80 U g⁻¹) for β -glycosidase and on 6 day (80 U g⁻¹) for endoglucanase (CMCase) and cellulase on filter paper (FPase) (4 U g⁻¹). After the enzymatic hydrolysis using the extract produced by the fungal consortium, the xylose and glucose release increased in SE about 10x (2.5 gL⁻¹ after 12 hours), indicating that the withdrawal of extractives positively influenced hydrolysis efficiency and yields in fermentable sugars. The extraction of the extractives also represented a positive factor for the decrease of the formation of inhibitor compounds of alcoholic fermentation, such as formic acid. In the second stage, the ethanol yield was evaluated from hydrolysates of sorghum biomass previously submitted to three different chemical pre-treatments (PTs): sodium hydroxide (NaOH-1 and 2%), hydrochloric acid (HCl = 0.34 and 1.5%) and alkaline hydrogen peroxide (H₂O₂-5 and 7.36%) using the commercial enzymes Celluclast 1.5 L (10FPU) and Novozym 188 (30CBU) in the hydrolysis and the yeast *Pichia stipitis* in the alcoholic fermentation. Among the evaluated PTs, PT with 7.36% H₂O₂ was the most efficient in lignin removal and preservation of the polysaccharide fraction. After the hydrolysis, it was observed that the xylose concentrations remained practically unchanged in the hydrolysates of SB "in natura" and SE (without extractives). However, in the pre-treated sorghum hydrolysates, a large increase in xylose concentration was observed, especially in the hydrolysates of pretreated HCl and H₂O₂ sorghum. This increase was even more significant in sorghum hydrolysates pretreated with 0.34% HCl and 5% H₂O₂. Regarding glucose, the sorghum pretreated with H₂O₂ favored the highest release of this monosaccharide after enzymatic hydrolysis. In addition, all hydrolysates showed low concentrations of inhibitors. After hydrolysis, the highest ethanol yields were obtained in fermentations carried out with the hydrolysates of SB pretreated with HCl (0.34 and 1.5%), obtaining 3.84 and 3, 61g.L⁻¹ ethanol,

corresponding respectively to 16.15 and 14.62% yield. The results indicated that sorghum biomass presents potential for use as raw material in the production of ethanol, opening prospects for additional studies in order to optimize the process and obtain more expressive yields in ethanol.

Keywords: Energy Crops. Enzymatic consortium. Lignocellulosic materials. Bioethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de estrutura dos constituintes da lignocelulose.	22
Figura 2 - Representação de uma cadeia de celulose.	25
Figura 3 - Representação de região cristalina e amorfa.....	25
Figura 4 - Ligações de hidrogênio nas cadeias da celulose.....	26
Figura 5 - Esquema representativo da fibra de celulose.....	26
Figura 6 – Unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses.....	28
Figura 7 – Representação de uma estrutura hipotética da xilana em seus diferentes substituintes.	29
Figura 8 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina: a) álcool p-cumarílico; b) – álcool coniferílico; c) – álcool sinapílico	29
Figura 9 - Estrutura dos álcoois a partir dos quais a lignina é sintetizada e suas subunidades.	30
Figura 10 - Fragmento de lignina apresentando as ligações C-O e C-C tipicamente presentes em sua estrutura nativa.	31
Figura 11 - Ação de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos.....	32
Figura 12 - Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de pentoses.	40
Figura 13 - Plantio e Colheita de SB.	55
Figura 14 – Pré-inóculo de <i>A. niger</i> SCBM1 e <i>A. fumigatus</i> SCBM6 crescendo em consórcio.	57
Figuras 15 e 16 - Fermentação em estado sólido e incubação a 30°C.	57
Figura 17 – Produção de hemicelulases por FES por consórcio fúngico (<i>A. niger</i> SCBM1 e <i>A. fumigatus</i> SCBM6), utilizando BC e FT como substratos.	62
Figura 18 – Produção de celulases por FES por consórcio fúngico entre <i>A. niger</i> SCBM1 e <i>A. fumigatus</i> SCBM6, utilizando BC e FT como substratos.....	64
Figura 19 – Produção de FPase por FES por consórcio fúngico entre <i>A. niger</i> SCBM1 e <i>A. fumigatus</i> SCBM6, utilizando BC e FT como substratos.....	65
Figura 20 - Pré-tratamento com NaOH	79
Figura 21 - Material retirado da autoclave para posterior filtração a vácuo.....	80
Figura 22 - Hidrólise enzimática do sorgo biomassa.	81
Figura 23 - Crescimento de <i>P. stipitis</i> em placas de petri.	82
Figura 24 - Preparo da fermentação dos hidrolisados.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do sorgo biomassa.	60
Tabela 2 - Produção de açúcares e inibidores após hidrólise enzimática de sorgo biomassa bruto (SB) e sem extrativos (SE). Valores expressos em g.L ⁻¹	66
Tabela 3. Composição química (%) do sorgo biomassa bruto (SB) e após pré-tratamentos (PT).....	84
Tabela 4 - Análise dos açúcares dos extrativos	86
Tabela 5 - Conteúdo total dos compostos fenólicos (TPC).....	86
Tabela 6 - Rendimentos em glicose e xilose após as hidrólises enzimáticas do sorgo biomassa.	88
Tabela 7 - Concentração de inibidores nos hidrolisados (g.L ⁻¹).....	90
Tabela 8 - Produção de etanol após fermentação alcoólica com <i>P. stipitis</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC	Bagaçõ de cana-de-açúcar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMCase	Carboximetilcelulase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
ETANOL 2G	Etanol de segunda geração
FES	Fermentação em estado sólido
FF	Furfural
FPase	Atividade de celulose em papel de filtro
FT	Farelo de trigo
HMF	Hidroximetilfurfural
LAI	Lignina ácida insolúvel
LAS	Lignina ácida solúvel
NREL	Laboratório Nacional de Energia Renovável
PTA	Pré-tratamento ácido
PTB	Pré-tratamento básico
PTPA	Pré-tratamento peróxido alcalino
PTs	Pré-tratamentos
SB	Sorgo biomassa
ρ NP	ρ -nitrofenol

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	18
1.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	18
1.2 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	19
1.3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
<i>1.3.1 Culturas energéticas e sorgo biomassa</i>	<i>22</i>
<i>1.3.2 Lignocelulose</i>	<i>24</i>
<i>1.3.3. Pré-Tratamentos da biomassa</i>	<i>31</i>
<i>1.3.4 Pré-tratamentos químicos</i>	<i>33</i>
<i>1.3.5 Microrganismos produtores de enzimas</i>	<i>35</i>
<i>1.3.6 Hidrólise enzimática</i>	<i>36</i>
<i>1.3.7 Fermentação alcoólica</i>	<i>38</i>
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 2	52
2.1 INTRODUÇÃO	52
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
<i>2.2.1. Sorgo biomassa</i>	<i>55</i>
<i>2.2.2 Caracterização do sorgo biomassa</i>	<i>55</i>
<i>2.2.3 Fermentação em estado sólido (FES)</i>	<i>56</i>
<i>2.2.4 Dosagem de enzimas</i>	<i>57</i>
<i>2.2.5 Hidrólise enzimática do sorgo biomassa</i>	<i>59</i>
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
<i>2.3.1 Caracterização química do sorgo biomassa</i>	<i>60</i>
<i>2.3.2 Dosagens de enzimas</i>	<i>61</i>
<i>2.3.2.1 Hemicelulases</i>	<i>61</i>
<i>2.3.2.2. Celulases</i>	<i>62</i>
<i>2.3.3 Hidrólise enzimática</i>	<i>65</i>
2.4 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
CAPÍTULO 3	74
3.1 INTRODUÇÃO	74
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	77

<i>3.2.1 Materiais</i>	77
<i>3.2.2 Retirada dos extrativos</i>	77
<i>3.2.3 Pré-Tratamentos</i>	78
<i>3.2.3.1 Pré-tratamento Ácido</i>	78
<i>3.2.3.2 Pré-tratamento Básico</i>	78
<i>3.2.3.3 Pré-tratamento com Peróxido Alcalino</i>	79
<i>3.2.4 Caracterização do sorgo biomassa</i>	79
<i>3.2.5 Hidrólise Enzimática</i>	80
<i>3.2.6 Fermentação Alcoólica</i>	82
<i>3.2.6.1 Microorganismo e meio de crescimento</i>	82
<i>3.2.6.2 Fermentação alcoólica com solução modelo e hidrolisados reais</i>	82
<i>3.2.7 Métodos analíticos</i>	83
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
<i>3.3.1 Caracterização do sorgo biomassa</i>	84
<i>3.3.2 Hidrólise Enzimática</i>	87
<i>3.3.3 Concentração de inibidores em hidrolisados</i>	89
<i>3.3.4 Rendimentos em etanol após a fermentação</i>	91
3.4 CONCLUSÕES	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE A – EQUAÇÕES DE CONVERSÃO	102
Caracterização do sorgo biomassa	102
Hidrólise Enzimática	102
Rendimento de Etanol	103

CAPÍTULO 1

1.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Esta tese foi dividida em três capítulos nos quais foram abordados:

Capítulo 1: Introdução, objetivos e referencial teórico, abordando os principais conceitos sobre culturas energéticas, biomassas lignocelulósicas, sorgo biomassa, etanol de segunda geração (etanol 2G), os tipos de pré-tratamento mais utilizados, enzimas envolvidas no processo de conversão da celulose e fermentação de hexoses (C6) e pentoses (C5).

Capítulo 2 - Experimentos realizados no Brasil:

- Caracterização do sorgo biomassa bruto (SB) e após a retirada dos extrativos (SE);
- Produção de celulasas e hemicelulasas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando consórcio microbiano entre espécies de *Aspergillus*;
- Avaliação da eficiência do extrato enzimático produzido por consórcio entre *A. fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1 na hidrólise de SB e sorgo extraído (SE).

Capítulo 3: Experimentos realizados durante o Doutorado Sanduíche na Universidad de Valladolid, Espanha.

Neste capítulo, comparou-se o efeito de três diferentes pré-tratamentos do sorgo biomassa nas hidrólises enzimáticas e nos rendimentos em açúcares e etanol, incluindo:

- Pré-tratamentos (ácido, básico e com peróxido alcalino);
- Caracterização do SB bruto e após cada pré-tratamento (PT) em relação aos teores de umidade, cinzas, lignina e holocelulose;
- Hidrólise com enzimas comerciais e quantificação dos açúcares e inibidores liberados;
- Fermentação alcoólica com *Pichia stipitis* e produção de etanol.

1.2 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A crescente demanda energética, a dependência das reservas de petróleo e os problemas ambientais têm estimulado a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis de fontes renováveis (KARAGÖZ *et al.*, 2012). Os biocombustíveis são combustíveis que podem ser apresentados na forma líquida, sólida ou gasosa derivados de biomassas vegetais, resíduos agroindustriais, algas e culturas energéticas como árvores e gramíneas de crescimento rápido (LIEW *et al.*, 2014).

Os resíduos agroindustriais brasileiros fornecem matéria-prima de grande potencial, cuja reutilização pode ser uma alternativa viável e de baixo custo para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de valor agregado (TRAVAINI *et al.*, 2013). O bioetanol (etanol de segunda geração ou etanol 2G) é um dos biocombustíveis com potencial para substituir a gasolina, que pode ser produzido a partir de biomassas lignocelulósicas previamente convertidas em açúcares fermentescíveis (PETROU *et al.*, 2009; TOQUERO; BOLADO, 2014).

As biomassas lignocelulósicas são recursos atraentes para a produção de etanol, uma vez que são renováveis, de baixo custo e amplamente disponíveis (SALADINI *et al.*, 2016). Entre elas, destacam-se os resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e casca de arroz (THANGAVELU *et al.*, 2016, RODRIGUES *et al.*, 2017b). Culturas energéticas de crescimento rápido e alta produtividade, como por exemplo o sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], também podem ser empregadas como matéria-prima, dada a sua flexibilidade como fonte de amido e lignocelulose (CARRILLO *et al.*, 2014). A vantagem das culturas é que podem crescer de forma sustentável em terras que não suportam culturas alimentares intensivas, sendo possível sua produção em diferentes localizações geográficas, tornando-se uma fonte de energia bastante versátil (MOHTASHAM, 2015).

O sorgo é uma cultura adaptável a diferentes condições de cultivo em todo o mundo, sendo adequado tanto para fins energéticos tradicionais como para a produção de etanol a partir de lignocelulose (CARRILLO *et al.*, 2014). Além disso, o sorgo é um material promissor devido ao seu crescimento vigoroso e rápido, podendo crescer até cinco metros de altura e produzir mais de 50 t ha⁻¹ de matéria seca por ciclo médio semestral (MAY *et al.*, 2014).

Neste contexto, foram realizadas pesquisas envolvendo variedades genéticas com elevada composição de biomassa, como o programa de melhoramento genético da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que desenvolveu um tipo de sorgo com um aumento no teor de biomassa, denominado *sorgo biomassa* (PARRELLA *et al.*, 2011). A

composição do sorgo biomassa (SB) se assemelha a outras culturas convencionalmente empregadas para a produção de etanol celulósico, como o bagaço de cana-de-açúcar (BC). No entanto, SB geralmente apresenta menor conteúdo de lignina e composição elevada em polissacarídeos (hemiceluloses e celulose) quando comparado ao BC (MAY *et al.*, 2014). Portanto, SB pode ser considerada uma cultura energética promissora e com grande potencial para a geração de etanol 2G (DEMIRBAS, 2009 ; HORST, 2017).

Os três principais componentes da lignocelulose são: celulose (30 a 45%), hemiceluloses (25 a 30%) e lignina (25 a 30%), que juntos compõem cerca de 90% da biomassa (PANDEY *et al.*, 2000; MAZA *et al.*, 2014). A celulose é um homopolissacarídeo linear de subunidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Este polímero contém regiões mais ordenadas (cristalinas) e amorfas, sendo a fração amorfa mais suscetível à despolimerização enzimática (MOTAUNG; ANANDJIWALA, 2015). As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose) e açúcares acetilados (ácido 4-O metil glucurônico, ácido α -D-galacturônico), contendo apenas regiões amorfas (PANDEY *et al.*, 2000; MAZA *et al.*, 2014). As hemiceluloses interagem diretamente com a lignina, levando à resistência da parede celular vegetal. A lignina é composta por uma estrutura macromolecular de unidades de fenilpropano de alta complexidade e recalcitrância, restringindo severamente a sacarificação enzimática de lignocelulose (PALONEN *et al.*, 2004). Nas biomassas lignocelulósicas, a matriz de polímeros de carboidratos é fortemente reticulada e ligada à lignina, limitando sua utilização para aplicações biotecnológicas (MAZA *et al.*, 2014). Como resultado, métodos eficazes de pré-tratamentos são necessários para desestruturar a matriz heterogênea e aumentar a porosidade do material, a fim de diminuir a associação entre a fração polissacarídica e a lignina e, dessa forma, melhorar a hidrólise enzimática. Além disso, as propriedades físico-químicas de cada componente de biomassa são diferentes e pré-tratamentos adequados com base nessas características são necessários (LAVARACK *et al.*, 2002; KARAGÖZ *et al.*, 2012).

Entre os pré-tratamentos químicos, o pré-tratamento ácido diluído utilizando ácido sulfúrico ou clorídrico (H_2SO_4 ou HCl, respectivamente) tem sido amplamente utilizado, uma vez que as hemiceluloses são efetivamente hidrolisadas por este método, aumentando assim a acessibilidade à celulose em diferentes fontes de biomassa, como palha de cana-de-açúcar (CHANDEL *et al.*, 2011), polpa de beterraba açucarada (ZHENG *et al.*, 2013) e palha de trigo (MARCOTULLIO *et al.*, 2011). O pré-tratamento alcalino também atua sobre o processo de deslignificação, na remoção das cadeias laterais de xilana e na redução da cristalinidade da celulose, aumentando substancialmente a suscetibilidade do substrato ao ataque enzimático

(PARK *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Além disso, esta técnica pode ser operada em temperaturas mais baixas e causar menor corrosão de equipamentos (MODENBACH e NOKES., 2012). Outra vantagem deste tipo de pré-tratamento é a redução do grau de polimerização e o aumento da porosidade do material (CHANDRA, 2012). O pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio e cálcio (NaOH e Ca(OH)₂) sob condições suaves tem sido comumente utilizado, evidenciando alta redução da lignina e solubilização de hemiceluloses em diferentes biomassas lignocelulósicas, como palha de arroz (OBEROI *et al.*, 2012) e palha de trigo (TOQUERO E BOLADO, 2014). Uma combinação de reagentes alcalinos e oxidantes também pode ser altamente eficaz na remoção de lignina e hemiceluloses, resultando no aumento da porosidade do material e na liberação de açúcares após a sacarificação da biomassa pré-tratada (MONTE *et al.*, 2011). Neste sentido, o pré-tratamento alcalino associado ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi efetivamente utilizado em diversas fontes lignocelulósicas, como bagaço de sorgo doce (CAO *et al.*, 2012), palha de colza (KARAGÖZ *et al.*, 2012) e cascas de arroz (DÍAZ *et al.*, 2013).

Vários estudos no Brasil e no mundo têm sido realizados na busca por uma hidrólise efetiva de materiais lignocelulósicos com elevados rendimentos em açúcares fermentescíveis e baixa formação de inibidores (CANILHA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013). No entanto, enzimas comerciais possuem um custo elevado. A fim de solucionar esse desafio, é necessário buscar microrganismos com potencial de produção de enzimas hidrolíticas eficientes, a fim de desenvolver um processo fermentativo economicamente viável (BON; FERRARA, 2007; MORETTI *et al.*, 2012). Essas enzimas lignocelulolíticas são produzidas principalmente por fungos filamentosos e vários estudos têm sido realizados para selecionar linhagens fúngicas com alta taxa de produção enzimática, principalmente celulasas e hemicelulasas, para serem utilizadas em processos de sacarificação (MORETTI *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013; BOONYUEN *et al.*, 2014).

Considerando-se o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar inicialmente a eficiência de um extrato enzimático produzido por fermentação em estado sólido (FES) empregando um consórcio entre *Aspergillus fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1 na hidrólise do sorgo biomassa bruto (SB) e após a retirada de extrativos (SE). Na segunda parte do trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos de três tipos de pré-tratamento do sorgo biomassa (ácido, básico e peróxido alcalino) na hidrólise enzimática e na fermentação alcóolica em relação aos rendimentos em açúcares e etanol.

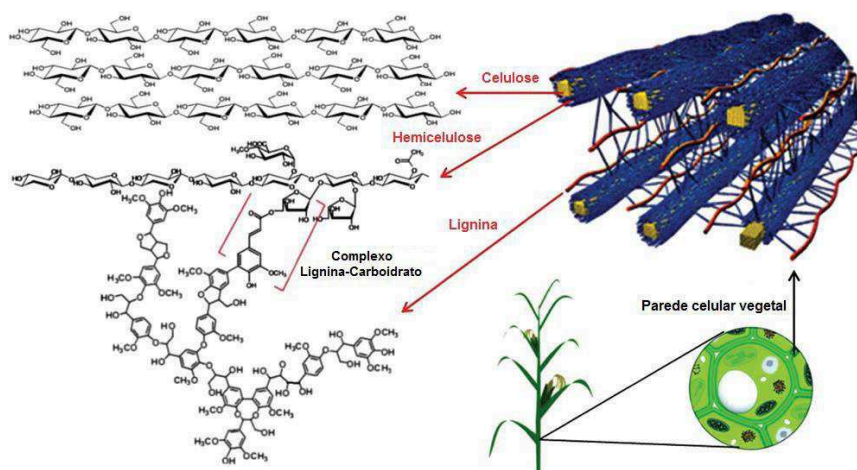
1.3 REFERENCIAL TEÓRICO

1.3.1 Culturas energéticas e sorgo biomassa

Biomassas lignocelulósicas são estruturas poliméricas e macromoleculares unidas entre si por interações intermoleculares e ligações covalentes, formando uma rede complexa e resistente a ataques microbianos que correspondem entre 97 a 99% de toda massa seca dos materiais vegetais (PERALTA *et al.*, 2017). Lignoceluloses são fontes promissoras de energia renovável e pesquisas nesta área têm sido impulsionadas pela possibilidade de esgotamento dos combustíveis fósseis e também pelos efeitos adversos que a queima destes materiais pode causar ao ambiente (RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). Este tipo de biomassa inclui além dos resíduos agrícolas, culturas energéticas, resíduos florestais, resíduos sólidos municipais e resíduos industriais (VOLYNETS; EIN-MOZAFFARI; DAHMAN, 2017). A lignocelulose (Figura 1) é constituída majoritariamente por celulose (33-55%), hemiceluloses (13-33%) e lignina (13-32%) (KIM; LEE; KIM, 2016), representando até 90% do peso seco total, sendo a massa restante atribuída a cinzas, proteínas estruturais e extrativos (BALAT, 2011).

No Brasil devido às fortes demandas energéticas, os setores de produção de energia têm buscado culturas alternativas de biomassa que se adequam aos panoramas agrícola e industriais desses empreendimentos (MAY *et al.*, 2014). Neste sentido, o sorgo se apresenta como uma cultura energética promissora, pois tanto o suco como o bagaço podem ser utilizados como fonte de açúcares (KORADIYA *et al.*, 2016; MATSAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2013).

Figura 1 - Modelo de estrutura dos constituintes da lignocelulose.



Fonte: Adaptado de Volynets, Ein-Mozaffari e Dahman (2017).

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma gramínea originária do continente africano, pertencente à família Poaceae (CABRAL *et al.*, 2013) de origem tropical e possui preferência por regiões de clima quente para o seu desenvolvimento. No Brasil, é cultivado em regiões cujas temperaturas médias estão acima de 20°C. O sorgo é uma planta que se adapta a vários tipos de solos, como solos heteromórficos, latossolos e até solos aluviais, mas não apresenta boa adaptação em solos com acidez elevada e alumínio tóxico (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008). O sorgo é uma espécie versátil abrangendo diversos segmentos no mercado agrícola mundial. Esse cereal apresenta cinco tipos diferentes: sorgo granífero (utilizado para produção de grãos), sorgo forrageiro (para a produção de massa para ensilagem), sorgo sacarino (produção de etanol de primeira geração), sorgo vassoura (para a produção de vassouras) e o sorgo lignocelulósico ou sorgo biomassa (utilizado na produção de biomassa lignocelulósica) (MAY *et al.*, 2014).

O sorgo biomassa [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma cultura energética lignocelulósica promissora que foi melhorada geneticamente para apresentar alto conteúdo de biomassa por hectare (MAY *et al.*, 2014). Esta variação de sorgo apresenta grande produtividade de matéria seca, podendo ser utilizado para produção de etanol de segunda geração - 2G ou geração de energia pela queima (MAY *et al.*, 2014). O programa de melhoramento genético da EMBRAPA - Milho e Sorgo, juntamente com a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), desenvolveu híbridos de sorgo biomassa sensível ao fotoperíodo, que é uma planta de dias curtos e que floresce em períodos do ano com noites longas. Dessa forma, se o dia for longo, a planta não floresce, enquanto se o dia for curto, menor que 12 horas e 20 minutos (período entre 21 de março e 22 de setembro na maior parte do Brasil), ocorre a indução floral e a planta florescerá. Assim, os cultivares de sorgo biomassa sensíveis ao fotoperíodo que forem cultivados em épocas do ano em regiões cujo fotoperíodo seja maior que 12 horas e 20 minutos, tardarão o desenvolvimento da gema floral, ampliando o ciclo vegetativo, possibilitando maior produção de biomassa por hectare/ciclo em comparação a cultivares insensíveis ao fotoperíodo (PARRELA *et al.*, 2011). O sorgo biomassa é propagado por sementes e permite total mecanização de seus processos de produção, corte e transporte. Além disso, o desenvolvimento vigoroso e rápido das plantas em ambientes tropicais, principalmente em regiões com elevadas temperaturas diurnas e noturnas proporciona maior facilidade no manejo inicial da cultura. Algumas variedades deste sorgo apresentam porte de cinco metros de altura e potencial para produzirem mais de 50 t ha⁻¹ de matéria seca por ciclo médio semestral (MAY *et al.*, 2014). Além da alta produtividade de biomassa, o sorgo biomassa é uma cultura que de acordo com resultados obtidos na avaliação de cultivares de sorgo

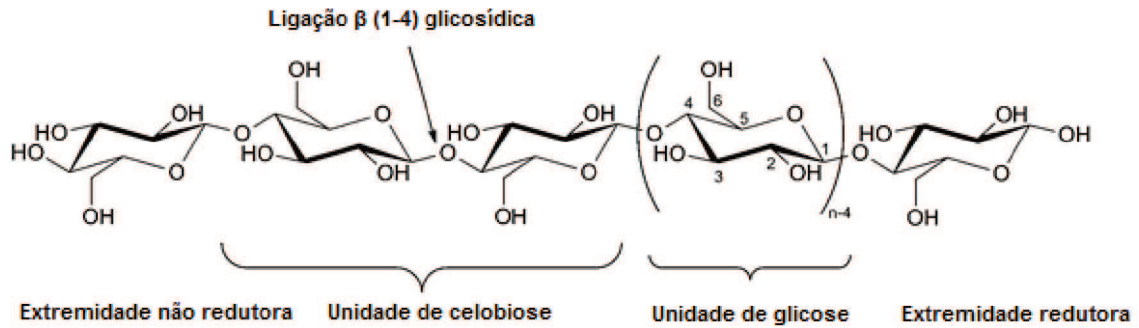
biomassa têm demonstrado em sua composição menor teor de lignina e maior conteúdo em polissacarídeos (hemiceluloses e celulose), o que a torna uma cultura promissora para a produção de etanol 2G (MAY *et al.*, 2014). No entanto, alguns cultivares têm demonstrado variações na porcentagem de lignina que, por sua vez, pode afetar o processo de sacarificação da biomassa em açúcares fermentescíveis (PALONEN *et al.*, 2004).

1.3.2 Lignocelulose

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose, hemiceluloses e lignina (BALAT, 2011). A celulose constitui o composto orgânico mais abundante na natureza, sendo o principal componente da parede celular dos vegetais (SOUZA; SANTOS, 2002; CHANDRA *et al.*, 2012). Esta macromolécula é um homopolissacarídeo linear com fórmula molecular $(C_6H_{12}O_6)_n$, constituído de 7.000 a 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (BRETHAUER; STUDER, 2015). As unidades de D-glicose se unem para formar um dissacarídeo conhecido como celobiose, que é a unidade fundamental da celulose (Figura 2).

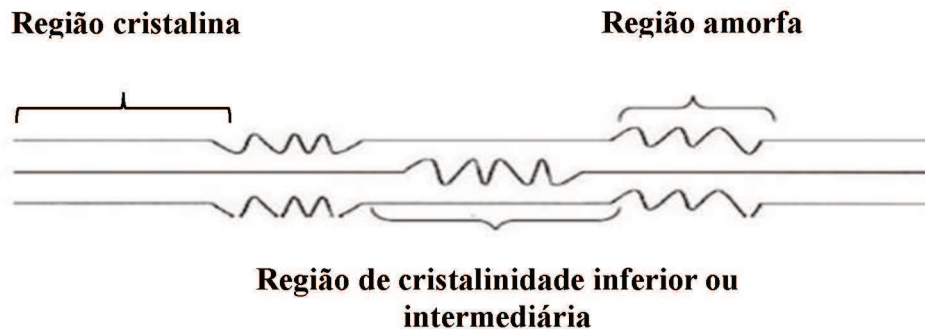
A celulose apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas e estruturadas e regiões menos ordenadas (de cristalinidade intermediária ou inferior) conhecidas como regiões amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FARINAS, 2011; MORETTI, 2012) (Figura 3). Sua estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, e ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares resultando na agregação também das cadeias celulósicas em “microfibrilas elementares” (Figura 4). Ao conjunto de microfibrilas denomina-se macrofibrilas, as quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal (Figura 5).

Figura 2 - Representação de uma cadeia de celulose.



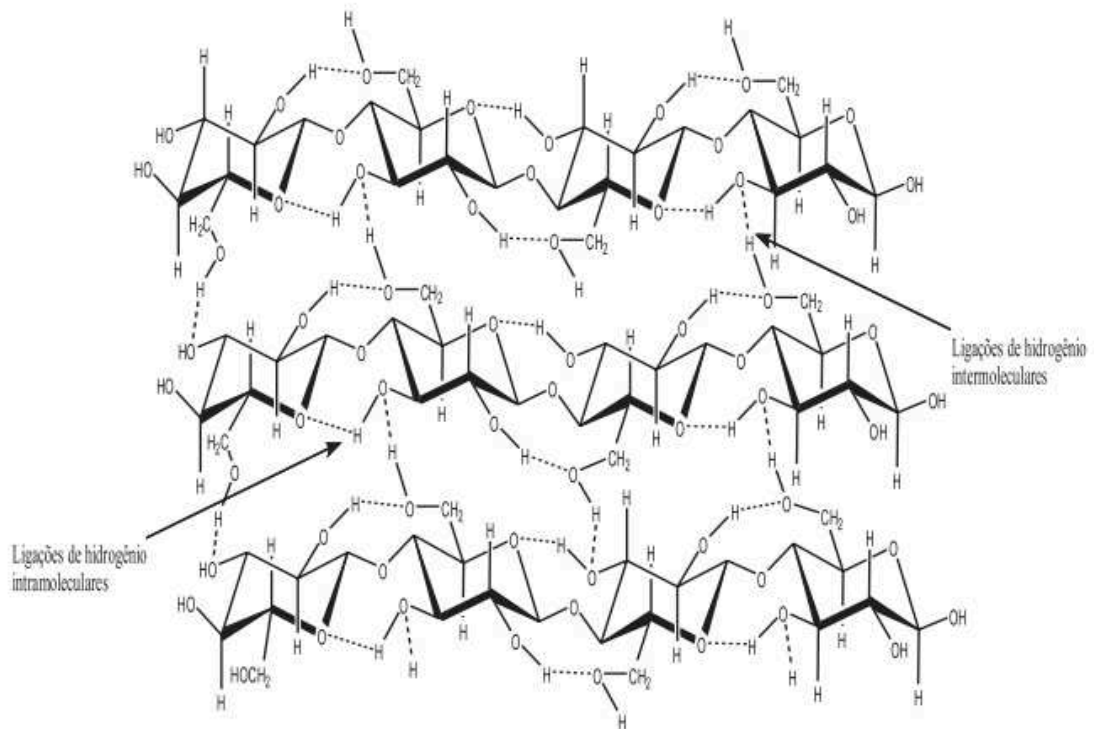
Fonte: Adaptado de Eyley e Thielemans (2014).

Figura 3 - Representação de região cristalina e amorfa.



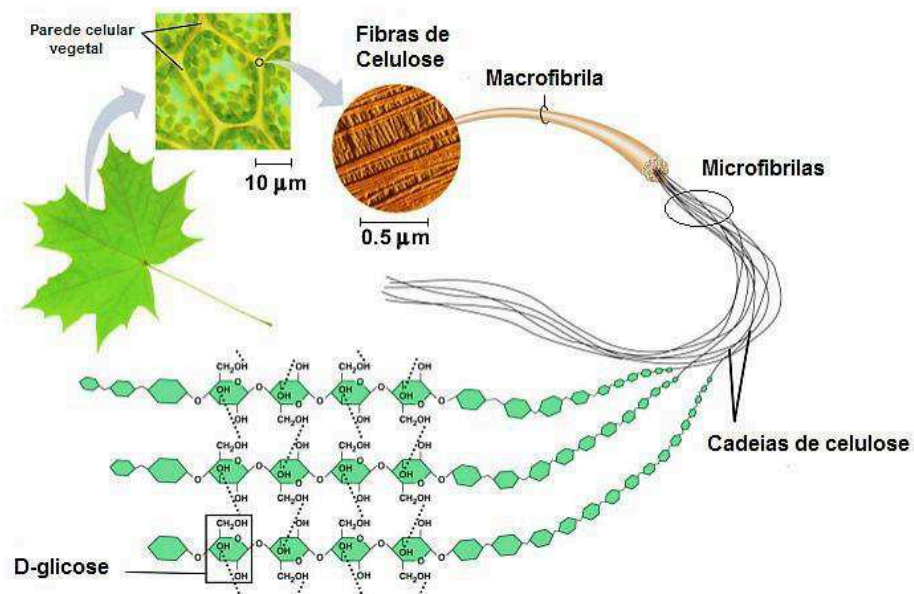
Fonte: Farinas (2011); Moretti (2012).

Figura 4 - Ligações de hidrogênio nas cadeias da celulose.



Fonte: Santos *et al.* (2012).

Figura 5 - Esquema representativo da fibra de celulose.



Fonte: Adaptado de Barley e Fitzpatrick (2011).

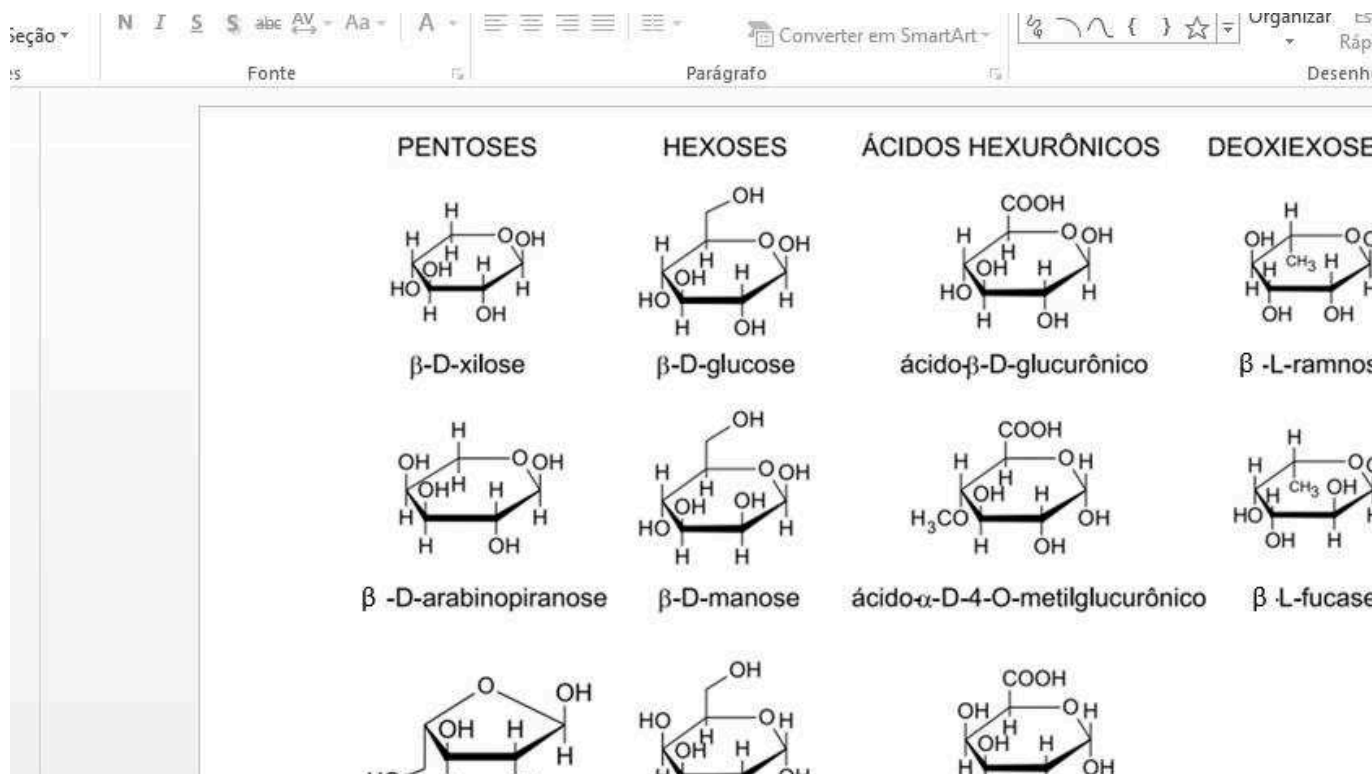
Este polissacarídeo apresenta elevada massa molecular e baixa flexibilidade das cadeias no polímero, o que lhe confere insolubilidade à água, sendo que neste caso, a solubilidade geralmente está inversamente relacionada ao comprimento do polímero. As ligações de pontes de hidrogênio intermoleculares e as superfícies planas permitem as interações entre as fibrilas, contribuindo para a insolubilidade do polímero na água e na maioria dos solventes orgânicos (BRANDT *et al.*, 2013).

As hemiceluloses são compostas por heteropolímeros com vários graus de ramificação, constituídos por cinco monômeros diferentes, entre eles: D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e D-glicose (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Geralmente, são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar mais frequente em sua cadeia principal, sendo a xilose e a manose os mais encontrados (Figura 6). Geralmente, dependendo da espécie da planta, do estágio de desenvolvimento e do tipo de tecido, podem ser encontradas diversas subclasses de hemiceluloses, incluindo glicuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glucomananas, galactomananas, galactoglicomananas e xiloglicanas (WYMAN *et al.*, 2005).

As hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e glucomananas, sendo as xilanas as mais abundantes (GÍRIO *et al.*, 2010), inclusive nas biomassas agrícolas (Figura 7). Por isso, o aproveitamento eficiente da xilana é imprescindível na utilização da biomassa lignocelulósica para processos de bioconversão, tanto para a produção de etanol como na indústria de alimentos (DA SILVA, 1992). Nas biomassas lignocelulósicas, a quantidade de hemiceluloses encontrada pode variar em função da espécie vegetal, do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais (BRIENZO, 2010). Ao contrário da celulose que possui regiões cristalinas e amorfas, as hemiceluloses possuem apenas regiões amorfas (SANTOS *et al.*, 2012). Uma de suas funções é integrar as fibrilas de celulose à lignina, envolvendo a celulose e formando uma barreira física natural, conferindo proteção contra ataques enzimáticos (PHILIPPINI, 2012). Devido à sua natureza não cristalina, as hemiceluloses são mais suscetíveis à despolimerização do que a celulose, especialmente em condições ácidas e básicas (BRANDT *et al.*, 2013).

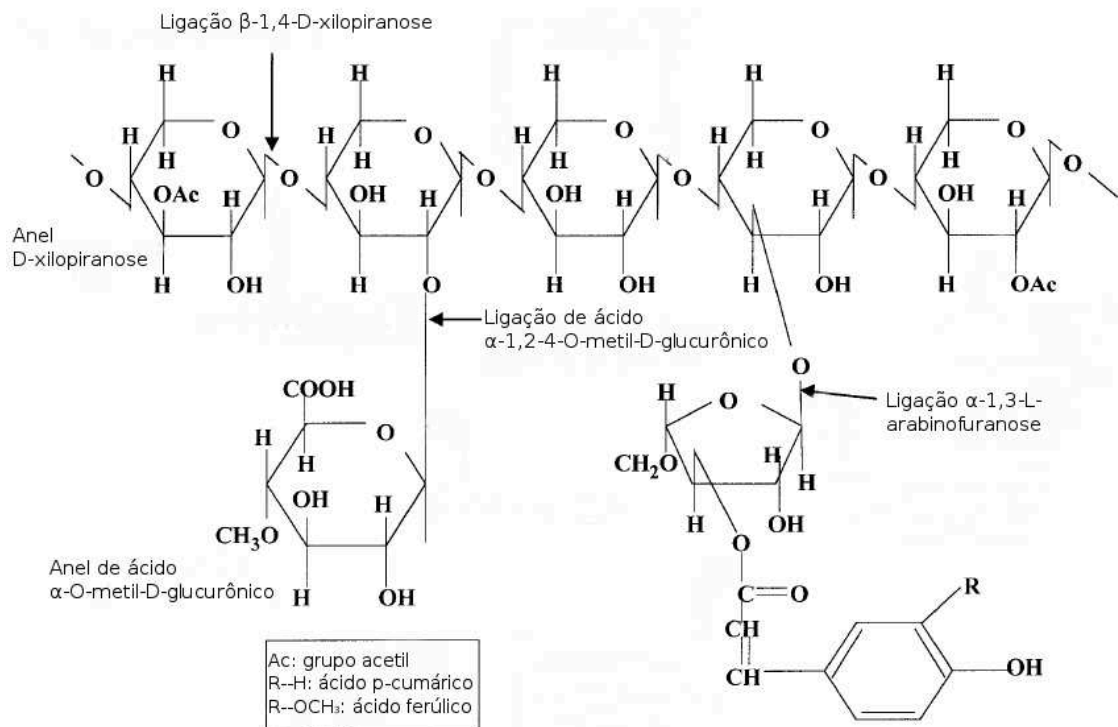
A lignina é uma macromolécula aromática insolúvel em água que fornece aos tecidos vegetais, impermeabilização, reforço estrutural e resistência ao ataque tanto biológico como ao ataque físico e químico. A lignina é biossintetizada a partir de três monômeros: álcool coniferílico, sinapílico e *p*-coumarílico (Figura 8). Uma vez incorporadas no polímero de lignina, as subunidades são identificadas pela sua estrutura de anel aromático, denominadas de guaiacial, siringila e *p*-hidroxifenila, respectivamente (XIAO; SUN; SUN, 2001) (Figura 9).

Figura 6 – Unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses.



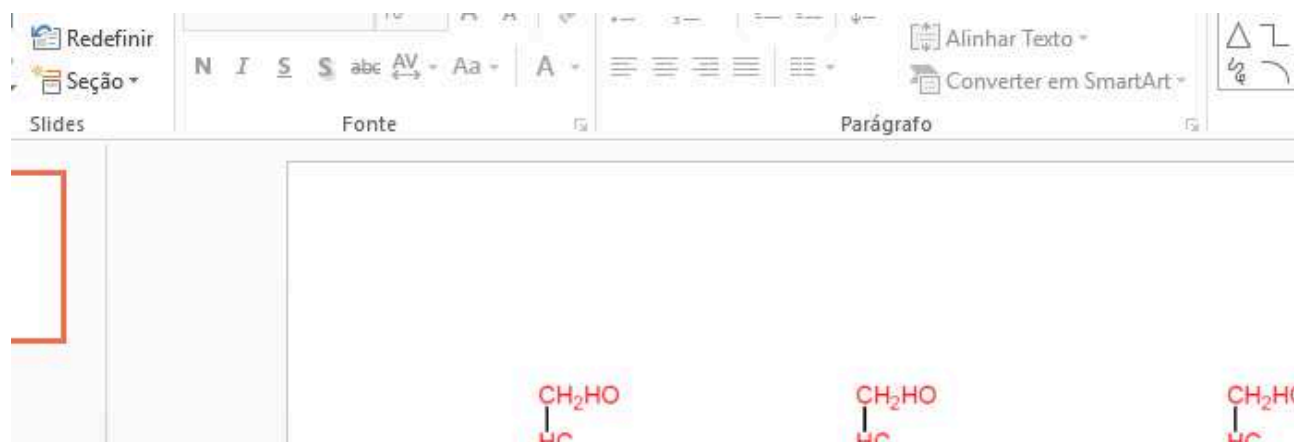
Fonte: Morais *et al.* (2005) com pequenas modificações.

Figura 7 – Representação de uma estrutura hipotética da xilana em seus diferentes substituintes.



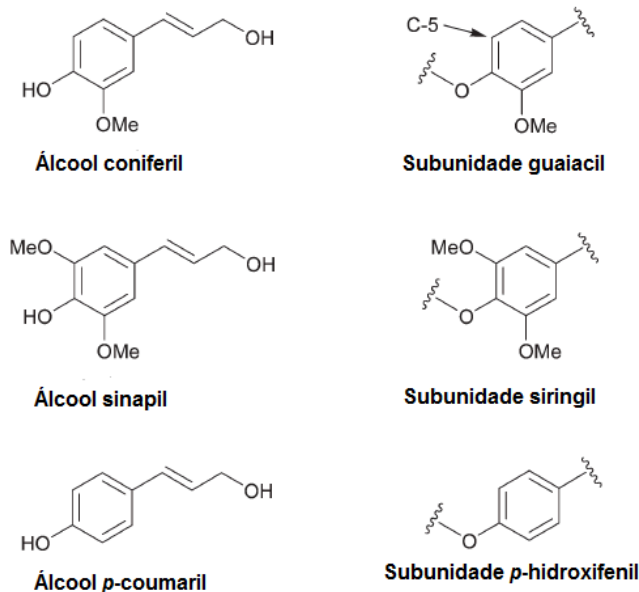
Fonte: Beg *et al.* (2001).

Figura 8 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina: a) álcool *p*-cumárico; b) – álcool coniferílico; c) – álcool sinapílico



Fonte: Rabelo (2007).

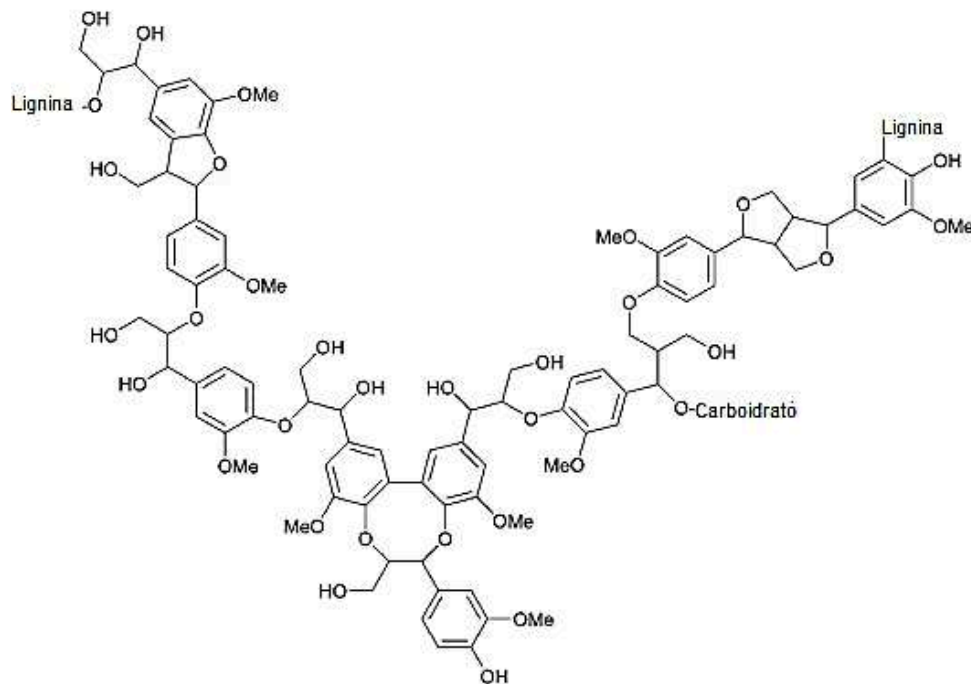
Figura 9 - Estrutura dos álcoois a partir dos quais a lignina é sintetizada e suas subunidades.



Fonte: Brandt *et al.* (2013).

A lignina é formada por uma ampla gama de ligações, sendo a ligação éter α - e β -O-4 as mais comuns (Figura 10). Cerca de 50% de todas as ligações entre as subunidades são deste tipo e levam a um alongamento linear da molécula. Existem outras ligações como as C-O e C-C que estão menos presentes e a ramificação ocorre quando a lignificação é avançada (EL HAG *et al.*, 2009). Por apresentar certa rigidez e recalcitrância, a lignina representa um dos principais entraves para a eficiente hidrólise da biomassa lignocelulósica (Mosier *et al.*, 2005), impedindo o acesso das hidrolases aos seus substratos. Além disso, ela afeta diretamente a sacarificação de materiais lignocelulósicos por adsorver de maneira irreversível as enzimas hidrolíticas, fenômeno conhecido como adsorção improdutivo, bloqueando o ataque à celulose (PALONEN *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2005). Nas etapas de pré-tratamento, a lignina pode ser degradada, resultando em uma variedade de compostos aromáticos que inibem hidrolases e organismos fermentativos, incluindo os ácidos orgânicos (ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido siríngico e ácido cumárico) (BERLIN *et al.*, 2006).

Figura 10 - Fragmento de lignina de gramíneas apresentando as ligações C-O e C-C tipicamente presentes em sua estrutura nativa.

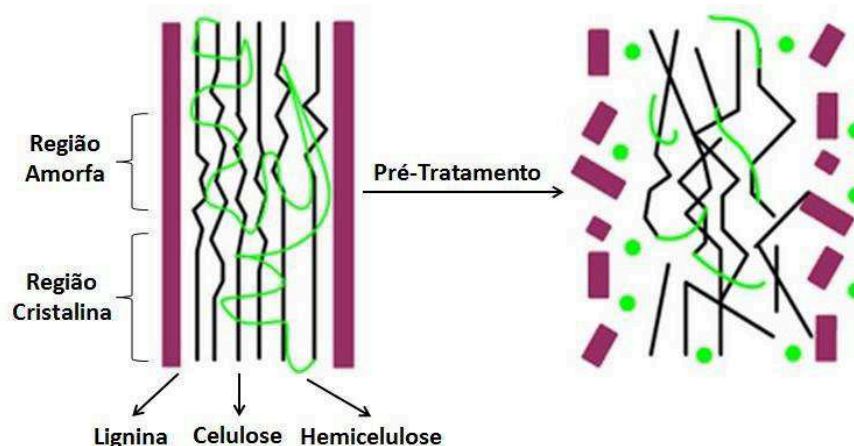


Fonte: Adaptado de Brandt *et al.*(2013).

1.3.3. Pré-Tratamentos da biomassa

O pré-tratamento consiste em desestruturar a biomassa para, então, submetê-la à hidrólise enzimática. Os pré-tratamentos são necessários a fim de remover a lignina e a hemiceluloses solubilizando e/ou degradando-as, reduzir o grau de polimerização da celulose e aumentar pelo menos parte da porosidade dos materiais lignocelulósicos (MOSIER, 2005) (Figura 11). Porém, devem ocorrer sem grande formação de compostos inibidores de fermentação e da hidrólise (LASER, 2001). Além disso, auxiliam na redução da recalcitrância do material lignocelulósico, aumentando sua digestibilidade, possibilitando que enzimas microbianas tenham um maior acesso à celulose, e assim, facilitando a conversão de carboidratos em açúcar fermentescíveis (KUMAR *et al.*, 2009).

Figura 11 - Ação de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos.



Fonte: Moiser *et al.* (2005).

Para ser considerado adequado e eficiente, um pré-tratamento deve resultar em alta recuperação de carboidratos, alta digestibilidade da celulose após a hidrólise enzimática, ocasionar baixa ou nenhuma formação de produtos de degradação de açúcares e lignina, ter baixa demanda de energia ou permitir que a energia empregada possa ser reutilizada em outras etapas. Além disso, um pré-tratamento eficiente, considerado ideal, deve resultar em elevada concentração de sólidos, bem como em altas concentrações de açúcares na fração líquida, ser realizado a baixos custos operacionais e permitir a transposição para escala industrial (SUN; CHENG, 2002).

A remoção da lignina da biomassa vegetal pode ser realizada utilizando diferentes tipos de pré-tratamentos tais como: físico-mecânicos, biológicos e químicos ou a associação destes (MESA *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2015). O pré-tratamento físico-mecânico inclui a trituração ou moagem e peneiração da fibra para que esta seja reduzida a pequenas partículas, tendo como principal vantagem o aumento da área de superfície do material e redução da cristalinidade da celulose (OGEDA; PETRI, 2010). O pré-tratamento biológico é realizado por microrganismos (fungos e bactérias) que são capazes de deslignificar e reduzir a massa molar da lignina, além de provocar uma hidrólise parcial das hemiceluloses (CHANDRA *et al.*, 2012). Esse tipo de pré-tratamento apresenta algumas vantagens por ter baixo gasto energético e também por poder ser realizado à temperatura ambiente. Por outro lado, a desvantagem é que, a porcentagem de lignina/hemicelulose extraída é muito baixa e os microrganismos consomem parte dos carboidratos disponíveis, levando a um menor rendimento em açúcares (OGEDA; PETRI, 2010; CHANDRA *et al.*, 2012). Os pré-tratamentos químicos, tais como ácido, alcalino, peróxido alcalino, ozonólise e organossolve, utilizam compostos químicos a fim de promover

a deslignificação, a diminuição de cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade. Porém, ao final do pré-tratamento, alguns inibidores podem ser formados sendo necessária à sua remoção (CHANDRA *et al.*, 2007).

1.3.4 Pré-tratamentos químicos

Existem vários tipos de pré-tratamentos químicos (ácido, alcalino, peróxido alcalino, ozonólise, organossolve, entre outros) e físico-químico (explosão a vapor), porém os custos e complexidade de cada método devem ser levados em consideração, visando sua aplicação em larga escala (BRIENZO *et al.*, 2015, 2017). O pré-tratamento ácido normalmente utiliza ácido sulfúrico (H_2SO_4) em temperaturas que podem atingir até $150^\circ C$ e pressões de até 10 atm (SUN *et al.*, 2004). A reação pode ser dividida em sete etapas: difusão de prótons pela matriz lignocelulósica umedecida, protonação do oxigênio da ligação éter entre os açúcares monoméricos, rompimento da ligação éter (glicosídica) e produção de um carbocátion intermediário, solvatação do carbocátion com água, regeneração de prótons e açúcares monoméricos, oligômeros ou polímeros dependendo de qual ligação éter for rompida e distribuição de produtos na fase líquida (HERRERA *et al.*, 2003).

A celulose é mais resistente ao pré-tratamento ácido do que as hemiceluloses, entretanto, dependendo da severidade do processo (concentração de ácido, temperatura e tempo de reação) pode gerar perdas de 2 a 20% de celulose (TRAJANO *et al.*, 2013). Essa perda de celulose ocorre principalmente na sua fração amorfa. Devido à natureza cristalina da celulose, são necessários valores de pH muito baixos, altas temperaturas e longos tempos de reação para afetar significativamente o material. Essas condições que favorecem o pré-tratamento ácido da celulose, atingindo a fração cristalina, podem degradar a glicose gerada em 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF), ácido fórmico e levulínico (FITZPATRICK, 2002). A razão entre regiões amorfas e cristalinas da celulose diminui após o pré-tratamento, podendo resultar em um aumento da cristalinidade do material (KUMAR *et al.*, 2009; BRIENZO *et al.*, 2015).

As hemiceluloses apresentam estruturas ramificadas e amorfas, sendo mais susceptíveis ao pré-tratamento ácido do que a celulose. Sendo assim, a fração hemicelulósica pode ser completamente removida sem causar grandes danos na celulose (AGUILAR *et al.*, 2002). Os açúcares que compõem as hemiceluloses podem ser liberados em solução como oligômeros ou monômeros, com razões que variam de acordo com temperatura, tempo e concentração de ácido (TRAJANO *et al.*, 2013). O aumento da temperatura pode gerar aumento na quantidade de

monômeros (EXCOFFIER *et al.*, 1991) e o aumento na concentração de ácido pode aumentar a remoção de hemiceluloses (KUMAR *et al.*, 2009).

A remoção de lignina em pré-tratamento ácido é relativamente baixa independentemente da biomassa utilizada e do agente acidificante (KUMAR *et al.*, 2009). Entretanto, a modificação na estrutura da lignina e sua realocação são fatores fundamentais para diminuir a recalcitrância do material (BRIENZO *et al.*, 2017). A remoção de lignina é acompanhada pela geração de monômeros aromáticos na fração líquida, com os tipos de fenóis variando de acordo com a biomassa pré-tratada e com as condições do pré-tratamento (DU *et al.*, 2010). Recentemente, um estudo detalhado sobre os efeitos do pré-tratamento ácido (BRIENZO *et al.*, 2017), sugeriu que a modificação da lignina é mais determinante na acessibilidade à celulose do que na mudança no grau de polimerização e cristalinidade.

Pré-tratamentos em condições severas na presença de ácidos combinados com altas temperaturas são passíveis à formação de produtos inibitórios devido à degradação dos açúcares e da lignina levando a formação de ácidos orgânicos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). A degradação das pentoses (xilose e arabinose) resulta na formação do furfural (FF), enquanto que na degradação das hexoses (glicose) o inibidor produzido é o hidroximetilfurfural (HMF). Ambos constituem um problema para a etapa de fermentação (MUSSATTO E ROBERTO, 2004). Ao ocorrer a degradação do FF e HMF, o ácido fórmico e o ácido levulínico são formados. A decomposição química parcial da lignina pode resultar na formação de alguns compostos fenólicos como o ácido hidroxibenzóico, vanilina e siringaldeído (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

Enquanto o pré-tratamento ácido atua preferencialmente na fração hemicelulósica, o pré-tratamento alcalino visa, principalmente a remoção da lignina, levando à destruição da estrutura e à separação das ligações entre lignina e carboidratos, reduzindo o grau de polimerização e cristalinidade e aumentando a porosidade da matéria-prima (SUN; CHENG, 2002). Os pré-tratamentos alcalinos podem utilizar diversos reagentes como hidróxido de sódio, cálcio e potássio (NaOH, Ca(OH)₂ e KOH) (SOTO *et al.*, 1994). Durante este tipo de pré-tratamento, as primeiras reações que ocorrem são solvatação e hidrólise, que causam inchaço na biomassa e proporcionam maior acessibilidade às enzimas. O principal efeito dos pré-tratamentos alcalinos é a remoção da lignina, melhorando a reatividade da fração polissacarídica devido à redução de obstáculos à ação de enzimas. Acredita-se que esse mecanismo envolve a hidrólise intermolecular de ligações éster entre as hemiceluloses e a lignina, aumentando a porosidade do material. Além disso, a adição de oxigênio na reação aumenta significativamente a deslignificação de materiais ricos em lignina em meio alcalino

(DA SILVA *et al.*, 2013). A remoção de grupos acetila das hemiceluloses por tratamento alcalino expõe a celulose, o que aumenta a eficiência da posterior hidrólise enzimática (KUMAR *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2010). Este método submete a biomassa em solução alcalina em temperaturas amenas durante horas ou dias. Deste modo, os açúcares são mais conservados do que após pré-tratamentos ácidos. Após a reação, o material é neutralizado a fim de ajustar o pH e de remover lignina, inibidores, sais, furanes e ácidos fenólicos (DA SILVA *et al.*, 2013).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) alcalino tem despertado interesse, pois é realizado com reagentes facilmente acessíveis e de baixa toxicidade e impacto ambiental, em condições brandas de temperatura e pressão e sem o emprego de ácidos. Além disso, este método é compatível com operações de separação, apresenta baixa formação de produtos secundários e produz elevada recuperação da celulose na forma de glicose após a hidrólise enzimática (BANERJEE *et al.*, 2012; RABELO *et al.*, 2011; RIVERA *et al.*, 2010). O H_2O_2 alcalino é um agente efetivo na deslignificação e solubilização das hemiceluloses. Isto é devido à formação do ânion hidroperóxido (HOO^-), produzido em pH alcalino, que apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, o H_2O_2 é instável nas condições alcalinas e se decompõe em radicais hidroxila (OH) e superóxido (O_2^-). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual reage em regiões de maior densidade eletrônica por serem espécies deficientes de elétrons, rompendo algumas ligações e, eventualmente, levando à dissolução da lignina e hemiceluloses (FANG *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2004).

1.3.5 Microrganismos produtores de enzimas

A celulose presente nas biomassas lignocelulósicas deve ser hidrolisada em monômeros de glicose livres. A hidrólise enzimática representa um desafio devido ao alto custo das enzimas necessárias para realizá-la (BAEYENS *et al.*, 2015). Como alternativa, atualmente, as enzimas utilizadas para hidrolisar tais materiais (celulases, hemicelulases e ligninases) podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) (SANTOS *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016). Vários microrganismos são capazes de produzir essas enzimas, tais como bactérias aeróbias e anaeróbias, fungos anaeróbios, fungos de podridão mole, fungos de podridão branca e fungos de podridão marrom (YOON *et al.*, 2014). No entanto, os fungos filamentosos são considerados como os principais produtores de enzimas e têm sido amplamente estudados (ALFENORE; MOLINA-JOUVEA, 2016; BANSAL *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2016).

Fungos filamentosos se destacam por serem mais adaptados ao crescimento em substratos sólidos, tais como resíduos agroindustriais, devido à formação de hifas, o que favorece a sua rápida colonização (DURAND, 2003). Esses microrganismos são de grande interesse devido à sua capacidade de secretar enzimas extracelulares que degradam a biomassa (GOMES *et al.*, 1998; BANSAL *et al.*, 2012; BAFFI, 2014). Um exemplo são as espécies do gênero *Aspergillus* que são conhecida como uma das principais produtoras de celulasas e hemicelulasas por FES em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo que podem ser empregados na hidrólise da celulose e hemiceluloses (SANTOS *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017a e 2017b). Lamounier *et al.* (2018) obtiveram alta produção de xilanase por linhagens de *Aspergillus* utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos. Moretti *et al.* (2012) observaram produção máxima de xilanase por *A. fumigatus*, utilizando os mesmos substratos. Rodrigues *et al.* (2017a) obtiveram elevada produção de xilanase e β -xilosidase por *A. niger* também com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e Dias *et al.* (2017) também produziram quantidades significativas de celulasas e hemicelulasas por crescimento de *A. niger* por FES empregando sorgo biomassa como substrato.

1.3.6 Hidrólise enzimática

A hidrólise da celulose pode ser dividida em cinco passos: transferência das enzimas de um meio aquoso para a superfície das partículas de celulose, adsorção das enzimas e formação do complexo enzima-substrato, hidrólise da celulose, transferência de oligômeros de glicose e celobiose das partículas celulósicas para o meio aquoso e hidrólise de oligômeros de celobiose em glicose no meio aquoso (WALKER *et al.*, 1991). Este processo está sob a influência de diversos fatores como a presença de lignina e hemiceluloses no substrato. A acessibilidade à celulose, é apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso da hidrólise enzimática (BRIENZO *et al.*, 2015). Além disso, a deslignificação de materiais lignocelulósicos proporciona maior conversão enzimática da celulose, principalmente quando se reduz a quantidade de lignina a níveis abaixo de 50% (MOONEY *et al.*, 1998). De fato, amostras com maior conteúdo de lignina podem ocasionar maior adsorção improdutiva de enzimas. As celulasas adsorvem na fração de lignina do material lignocelulósico, prejudicando a hidrólise da celulose (OOSHIMA *et al.*, 1990; LU *et al.*, 2002).

As celulasas compõem um sistema enzimático que despolimeriza a celulose em glicose pelo rompimento das ligações glicosídicas. As celulasas são divididas em três classes: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as β -

glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) que agem de forma sinérgica, onde o efeito das enzimas combinadas é maior do que o efeito de cada uma agindo isoladamente (JEOH *et al.*, 2002). As endoglucanases são responsáveis por clivar a celulose internamente ao longo da cadeia. Já as celobiohidrolases são capazes de agir nas terminações livres da cadeia (extremidades redutoras e não-redutoras) geradas pelas endoglucanases, hidrolisando a celulose e produzindo unidades de celobiose (dímero de glicose). Por fim, as β -glicosidases finalizam o processo por meio da hidrólise de celobiose em monômeros de glicose (WALLACE *et al.*, 2016).

Já as hemicelulases atuam na degradação das hemiceluloses, permitindo maior acesso às fibras de celulose. Devido à alta complexidade estrutural das hemiceluloses, várias enzimas são requeridas para a sua completa degradação, tais como α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, α -D-galactosidase e acetil-xilano-esterase que atuam nas cadeias laterais (FARINAS, 2011). Após a liberação das cadeias laterais, a cadeia principal composta por xilana pode ser clivada por xilanases e β -xilosidases (RYABOVA *et al.*, 2009). As xilanases (endo-1,4- β -xilanaase ou 1,4- β -D-xilano-hidrolase; EC 3.2.1.8) e as β -xilosidases (1,4- β -D-xilano-hidrolase; EC 3.2.1.37) são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, sendo que a endo-1,4- β -xilanaase cliva internamente a cadeia de xilana, enquanto a β -xilosidase hidrolisa pequenos oligossacarídeos em xilose livre. Dessa forma, a ação sinérgica de celulases e hemicelulases potencializa a hidrólise de resíduos lignocelulósicos e conseqüentemente, o rendimento em monossacarídeos (GÍRIO *et al.*, 2010).

Grande parte da hidrólise enzimática é realizada com enzimas comerciais. Porém, o alto custo dessas enzimas ocasionou um gargalo na sua aplicação industrial para a produção de açúcares fermentescíveis (SIQUEIRA *et al.*, 2010; ANG *et al.*, 2013). Assim, a disponibilidade de celulases de baixo custo, bem como a utilização de substratos mais baratos na sua produção, como o bagaço de cana-de-açúcar, pode tornar o processo menos dispendioso (ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, a capacidade de alguns microrganismos em crescer em substratos lignocelulósicos e produzir celulases e hemicelulases pode contribuir adicionalmente para bioconversões economicamente viáveis (BANSAL *et al.*, 2012).

Pesquisas voltadas para aperfeiçoar a hidrólise enzimática têm sido realizadas com coquetéis enzimáticos de extratos fúngicos brutos que contenham atividades mistas celulolíticas e xilanolíticas (MORETTI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015; BUSSAMRA, *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2017). Dessa forma, para a obtenção de bons resultados após a sacarificação, é importante o uso de uma mistura enzimática eficiente com amplo espectro de ação que maximize a

conversão do substrato (celulose e hemiceluloses) em monossacarídeos, com baixo consumo de energia, baixa geração de subprodutos e com menor custo de produção (ZHOU *et al.*, 2009).

1.3.7 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e dióxido de carbono (CO₂). Este processo envolve a conversão de uma molécula de glicose a duas de piruvato por meio da glicólise em uma série de 10 reações ordenadas, cada qual catalisada por uma enzima específica. Em seguida, o piruvato é descarboxilado a aldeído acético e este, por fim, é reduzido a etanol (LEHNINGER *et al.*, 2000). Este processo é realizado principalmente por leveduras, no citoplasma, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e, ainda, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol somente um subproduto desse processo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A eficiência da produção de etanol gerado ao longo da fermentação depende da quantidade de açúcares presentes no meio. A produção de etanol de primeira geração (etanol 1G) se inicia pela ação da exoenzima invertase ou sacarase que, por meio da hidrólise, converte a sacarose presente no caldo de cana nos monossacarídeos glicose e frutose. Em seguida, a frutose é isomerizada a glicose e a glicose pode então entrar na via glicolítica, com a posterior fermentação de piruvato a etanol (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, são produzidos dois tipos de açúcares: as pentoses (C5) e as hexoses (C6). As hexoses são obtidas tanto da degradação da celulose e de parte das hemiceluloses. Já as pentoses são oriundas da hidrólise da fração hemicelulósica (FUGITA, 2010). Portanto, no caso do etanol de segunda geração (etanol 2G), sua produção é proveniente da fermentação dos açúcares C6 e C5 presentes nos hidrolisados de biomassa. Esses monossacarídeos são assimilados pela célula da levedura (aeróbio facultativo), que os metaboliza durante a fermentação em condições de anaerobiose ou na respiração em condições de aerobiose (LEHNINGER *et al.*, 2000).

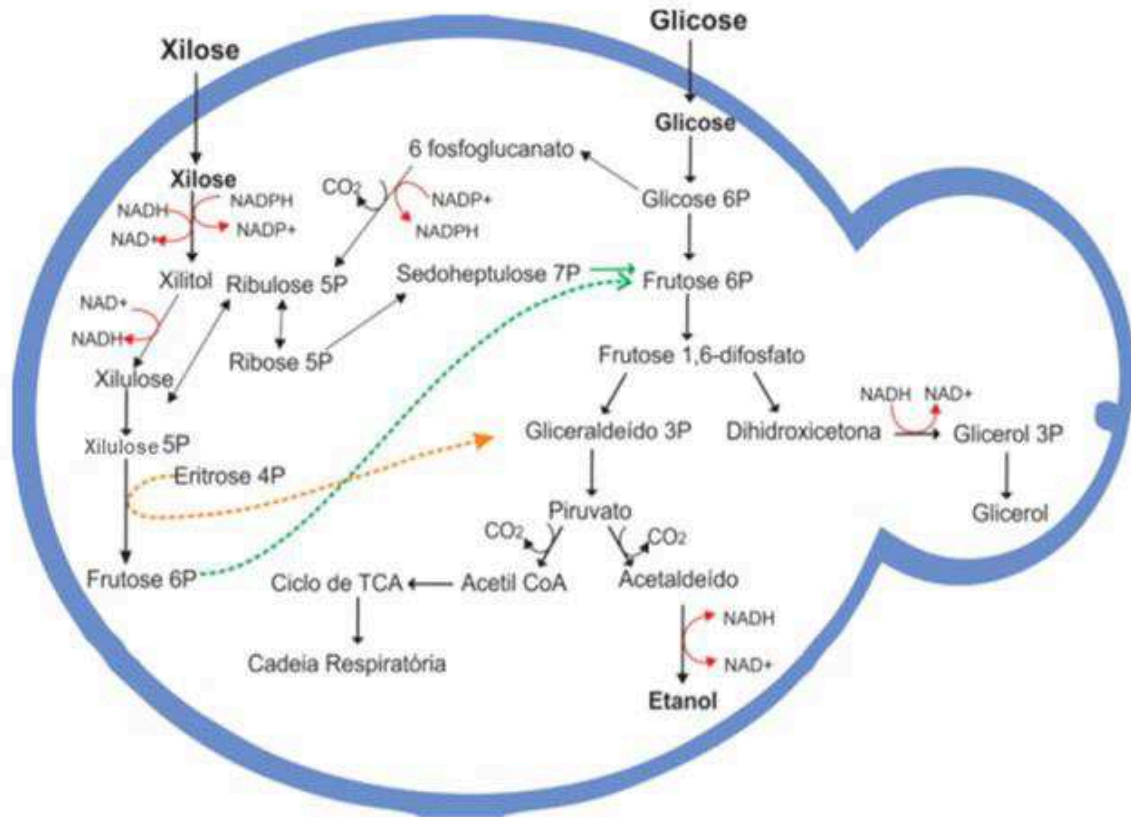
No processo de fermentação, os produtos hidrolisados incluindo C6 monoméricas (glicose, manose e galactose) e C5 (xilose e arabinose) serão fermentados para produtos de valor agregado, tais como o etanol 2G. Entre estes produtos hidrolisados, a glicose é normalmente o mais abundante, seguida por xilose ou manose e outros açúcares de menor

concentração. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo frequentemente e tradicionalmente utilizado para a fermentação de hexoses (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2006). A *S. cerevisiae* tem algumas vantagens tais como a alta taxa de fermentação e a tolerância ao etanol. No entanto, esta levedura é incapaz de fermentar xilose a etanol (CHU; LEE, 2007). Para a bioconversão lignocelulósica industrial ser economicamente viável é necessário escolher microrganismos capazes de fermentar tanto glicose como xilose.

Uma das limitações de utilizar somente *S. cerevisiae* na produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico é que ela não apresenta habilidade para utilizar pentoses como xilose e arabinose (CARDONA *et al.*, 2010). Porém, se a xilose for convertida a xilulose pela enzima xilose isomerase, *S. cerevisiae* pode fermentar xilulose a etanol. Outra maneira de utilizar xilose por *S. cerevisiae* é pelo desenvolvimento de linhagens recombinantes com genes que codifiquem as vias enzimáticas para utilização da xilose (MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

A utilização de pentoses (C5) pode ser realizada por leveduras que metabolizam a xilose (Figura 12), convertendo-a em etanol por meio da via metabólica das pentoses-fosfato. A primeira fase do metabolismo da xilose constitui-se no transporte do açúcar através da membrana celular mediado por transportadores de glicose na ausência de um transportador específico para C5 (BARBOSA, 2017). No citoplasma da célula, a xilose passa então por duas reações de oxi-redução sendo convertida a xilitol e posteriormente a xilulose, que sofre uma fosforilação para xilulose 5-fosfato. A conversão da xilose a xilitol é realizada pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima desta via metabólica, sendo que esta reação é dependente das coenzimas NADH ou NADPH (JEFFRIES *et al.*, 1983, FUGITA, 2010). O xilitol produzido pode então ser excretado ao meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XD), com a atuação de NAD^+ como coenzima (FUGITA, 2010). A xilulose formada é fosforilada pela enzima xilulose quinase (XQ), produzindo então a xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses (FUGITA, 2010).

Figura 12 - Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de pentoses.



Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal (1994) ; Barbosa (2017).

Certas leveduras, como *Pichia stipitis*, *P. segobiensis*, *Candida tenuis*, *C. shehatei* e *Pachysolen tannophilus*, são capazes de fermentar xilose a etanol, devido à dupla especificidade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (TOIVOLA *et al.*, 1985). As taxas de produção de etanol, no entanto, são mais baixas, quando comparadas às da fermentação de glicose por *S. cerevisiae* (BON *et al.*, 2008). Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura-se como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que fermenta xilose a etanol com elevado rendimento (CHO *et al.*, 2010). Alguns estudos têm demonstrado bons rendimentos em etanol após fermentações empregando linhagens de *P. stipitis*. Toquero e Bolado (2014), por exemplo, empregaram hidrolisados de palha de trigo pré-tratada com peróxido alcalino como substrato na fermentação alcoólica com *P. stipitis* e produziram concentrações elevadas de etanol (17,37 g.L⁻¹).

Dentro deste contexto e diante da necessidade da expansão na produção de bioetanol, o sorgo biomassa pode ser uma matéria-prima com características promissoras para o desenvolvimento de novas pesquisas a partir de biomassas lignocelulósicas.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R. *et al.* Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309-318, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00106-1)
- ALFERORE, S.; MOLINA-JOUVEA, C. Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. **Bioprocess Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1747-1756, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.028>
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293–1302, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>
- ARAÚJO, C. R. *et al.* Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **Seminário estudantil de produção acadêmica**, UNIFACS, v. 12, 2013.
- BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60 – 88, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>
- BAFFI, M. A. Enzimas microbianas envolvidas na produção de etanol celulósico a partir de resíduos agroindustriais. **Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 33., 2014, Uberlândia, *Anais [...]*. Uberlândia: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2014. p. 323-334.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- BANERJEE, G.; CAR, S., LIU, T.; WILLIAMS, D. L.; MEZA, S.L.; WALTON, J. D.; HODGE, D. B. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 922-931, 2011. <https://doi.org/10.1002/bit.24385>
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; GUPTA, J. K.; SONI, R.; SONI, S. K. A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. **BioResources**, v. 6 (1), p. 552-569, 2011.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341 – 1346, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- BARBOSA, G. M. P. **Avaliação do Potencial de Leveduras Selvagens para a fermentação Alcoólica De D-Xilose**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

- BARLEY, E.; FITZPATRICK, K. The structure and function of large biological molecules. *In: REECE, J. B. et al. (ed.). Campbell biology*. 9th ed. Boston: Benjamin Cummings/Pearson, 2011. chap. 5. Disponível em: <https://www.slideshare.net/kindarspirit/05-the-structure-and-function-of-large-biological-molecules>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326–338, 2001. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- BERLIN, A. *et al.* Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198-209, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021>
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. Document prepared for "The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries", an FAO seminar held in Rome on, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/biotech/docs/bon.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.
- BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. *In: BOM, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-27, 2008.
- BOONYUEN, N.; MANOCH, L.; LUANGSA-ARD, J. J.; PIASAI, O.; CHAMSWARNG, C.; CHUASEEHARONNACHAI, C.; UEAPATTANAKIT, C.; ARNTHONG, J.; SRI-INDRASUTDHI, V. Decomposition of sugarcane bagasse with lignocellulose-derived thermotolerant and thermoresistant Penicillia and Aspergilli. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 92, p. 86-100, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.013>
- BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLET, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, London, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013. <https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>
- BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - a review. **Chimia**, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015. <https://doi.org/10.2533/chimia.2015.572>
- BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.
- BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p. 271-280, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.037>
- BRIENZO, M.; TYHODA, L.; BENJAMIN, Y.; GORGENS, J. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 253-262, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.12.007>

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture design cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173-181, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>

CABRAL, P. H. R.; JAKELAITIS, A.; CARDOSO, I. S.; ARAÚJO, V. T.; PEDRINI, E. C. F. Interferência de plantas daninhas na cultura do sorgo cultivado em safrinha. **Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia**, v. 43, n. 3, p. 308-314, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000300008>

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L.C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1 – 15, 2012.

CAO, W.; SUN, C.; LIU, R.; YIN, R.; WU, X. Comparison on the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 215-221, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.034>

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>

CARRILLO, M. A.; STAGGENBORG, S. A.; PINEDA, J. A. Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. **Fuel**, v. 116, p. 427–431, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.028>

CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; NARASU, M. L.; RAO, L. V. Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS3. **New Biotechnology**, v.28, n.6, 593–599, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.002>

CHANDRA, R. P., BURA, R, MABEE, W. E., BERLIN. A., PAN, X. SADDLER. J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.67–93, 2007. https://doi.org/10.1007/10_2007_064

CHANDRA, R. P.; TAKEUCHI, H., HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462-1476, 2012. https://doi.org/10.1007/10_2007_064

CHEN, H.; ZHOU, D.; ZHANG, S.; CHEN, J. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 427 – 437, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.086>

CHO, D. H.; Shin, S.J.; Bae, Y.; Park, C.; Kim, Y.H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4947-4951, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.014>

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.04.001>

DA SILVA, A. S. A.; TEIXEIRA, R. S. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S., BARROS, R. R. O.; BON, M. A. F. E. P. S. Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, p. 47-88, 2013. <https://doi.org/10.5772/53378>

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp. 179-5 e aplicação destas enzimas**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

DEMIRBAS, A. Biofuels securing the planet's future energy needs. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 9, p. 2239-2249, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.05.010>

DIAS, L. M; DOS SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; BAETA, B. E. L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus Niger* and *A. Fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 708–718, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13672>

DÍAZ, A.; TOULLEC, J. L.; BLANDINI, A.; ORY, I.; CARO, I. Pretreatment of rice hulls with alkaline peroxide to enhance enzyme hydrolysis for ethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 949-954, 2013.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-125, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00124-9)

EMBRAPA MILHO E SORGO. (2008). *Sistemas de Produção*, 2. Cultivo do sorgo – Plantio. ISSN 1679-012X. Versão Eletrônica - 4ª edição. Set. 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/plantio.htm>. Acesso em: 21 abr. 2016.

EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 11, p. 1308-1317, 1991. <https://doi.org/10.1002/bit.260381108>

EYLEY, S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. **Nanoscale**, v. 6, p. 7764-7779, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4NR01756K>

FANG, J. M.; SUN, R.C.; SALISBURY, D.; FOWLER, P.; TOMKINSON, J. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 66, p. 423-432, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00095-6](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00095-6)

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **EMBRAPA, Documentos 54**, 2011.

FITZPATRICK, S. W. Final technical report: Commercialization of the Biofine technology for levulinic acid production from paper sludge. **BioMetics**, 2002. <https://doi.org/10.2172/771246>

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Área de Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4775-800, 2010.

GOMES, A. F. S.; SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A. Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 915 – 921, 2016.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Revista Microbiologia**, v. 29, p. 187-192, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141998000300008>

HAHN – HÄGERDAL, B.; GLABE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDE, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549 – 556, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v. 37, n. 3, p. 267-274, 2003. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0510>

HORST, D. J. Lignin as alternative fuel: an estimate of the thermal energy generation potential from Brazilian crops. **Environ Prog sustain energy**, v. 36, 2017, p. 717-722. <https://doi.org/10.1002/ep.12441>

JEFFRIES, J. B.; BARLOW, S. E.; DUNN, G. H. Theory of Space-Charge Shift of Ion Cyclotron Resonance Frequencies. **Int. J. Mass Spectrom and Ion Processes**, v. 54, p. 169-187, 1983. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(83\)85016-2](https://doi.org/10.1016/0168-1176(83)85016-2)

JEOH, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Cooperative and competitive binding in synergistic mixtures of thermobifida fusca Cellulases Cel5A, Cel6B, and Cel9A. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 4, p. 760-769, 2002. <https://doi.org/10.1021/bp0200402>

JIANG, Y.; DUARTE, A. V.; BRINK, J.; WIEBENGA, A.; WANG, C.; VRIES, R. P.; ZHOU, Z.; BENOIT, I. Enhancing saccharification of wheat straw by mixing enzymes from genetically-modified *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.38, n. 1, p. 65 – 70, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1951-9>

KARAGOZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapessed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and Co-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 349-357, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.075>

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for

bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>

KORADIYA, M.; DUGGIRALA, S.; TIPRE, D.; DAVE, S. Pretreatment optimization of Sorghum pioneer biomass for bioethanol production and its scale-up. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 142 – 147, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.156>

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948-3962, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>

LAMOUNIER, K. F. P.; RODRIGUES, P. O.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Saccharification of sugarcane bagasse using an enzymatic extract produced by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Renewable Materials**, v. 6, p. 169-175, 2018. <https://doi.org/10.7569/JRM.2017.634151>

LASER, M. **Hydrothermal pretreatment of cellulosic biomass for bioconversion to ethanol**. Ph.D. Thesis, Thayer School of Engineering, Dartmouth College, 2001.

LAVARACK, B. P.; GRI, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 13, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00066-1)

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIEW, W.H.; HASSIM, M.H., Ng, D.K.S. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 71, p. 11 – 29, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006>

LIMA, U.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: Lima, U. A. et al (ed.) **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, v. 3, p.1-43, 2001.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S.D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98, n. 1-9, p. 641-654, 2002. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:641>

MARCOTULLIO, G.; KRISANTI, E.; GIUNTOLI, J.; JONG, W. Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl₃ solutions under mild conditions. X-ray and thermo-gravimetric analysis of the solid residues. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5917-5923, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.092>

MATSAKAS, L.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fermentation of liquefacted hydrothermally pretreated sweet sorghum bagasse to ethanol at high-solids content. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 202 – 208, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.107>

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial

xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2392-2398, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.047>

MAY, A.; PARRELLA, R. A. C.; DAMASCENO, C. M. B.; SIMEONE, M. L. F. Sorgo como matéria-prima para produção de bioenergia: etanol e cogeração. **Sorgo: inovações tecnológicas**, v. 35, n. 278, p. 73 – 81, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11245-014-9280-5>

MAZA, M.; PAJOT, P. J.; AMOROSO, M. J.; YASEM, M. G. Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 18-25, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.020>

MESA, L.; LOPEZ, N.; CARA, C.; CASTRO, E.; GONZALEZ, E.; MUSSATTO, S. I. Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 86, p. 270-279, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.105>

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment - A Review. **Biotechnology Bioengy**, v. 109, p. 1430-1442, 2012. <https://doi.org/10.1002/bit.24464>

MOHTASHAM, J. Review Article-Renewable Energies. **Energy Procedia**, v. 74, p. 1289 – 1297, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.07.774>

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Applied Energy**, v. 88, p. 403-408, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.08.009>

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D. TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p.113-119, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00181-8)

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da Madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.29, n.3, p.461-470, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000300014>

MORETTI, M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RORIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. L.; NUNES, C. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, 2014, p.189-195, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.020>

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673 – 686, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

MOTAUNG, T. E.; ANANDJIWALA, R. D. Effect of alkali and acid treatment on thermal degradation kinetics of sugar cane bagasse. **Industrial Crop. and Products**, v. 74, p. 472-477, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.062>

MUSSATO, S. L.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. 93, 1-10, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; SANDHU, S. K.; DHALIWAL, S. S.; KHAUR, U.; CHADHA, B.S., BARGHAV, V. K. Ethanol production from alkalil-treated rice straw via simulyaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 557-566, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1060-2>

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

OLIVEIRA, L. R. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; . ROCHA, J. G. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1-7, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.037>

OOSHIMA, H.; BURNS, D. S.; CONVERSE, A. O. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignacious residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 5, p. 446-452, 1990. <https://doi.org/10.1002/bit.260360503>

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibitors and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology, Amsterdam**, v. 107, p. 65-72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.011>

PAN, G. X.; BOLTON, J. L.; LEARY, G. J. Detremination of ferulicand p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. **Journal of Agriculture and Foog Chemistry**, v. 46, p. 5283-5288, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980608f>

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1069-1079, 2005. <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1069>

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

PARRELA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. Desempenho agrônômico de híbridos de sorgo biomassa. **EMBRAPA Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 41, p. 21, 2011.

PARK, J. Y.; SHIROMA, R.; AL-HAQ, M. I.; ZHANG, Y.; IKE, M.; ARAI-SANO, Y.; IDA, A.; KONDO, M.; TOKUYASU, K. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6805-6811, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.098>

PERALTA, R. M. *et al.* Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: GOUTAM BRAHMACHARI (Ed.). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. 1. ed. [s.l.] 119-149, 2017. p. 119–149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar**: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas. 82f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 150f. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, R. R. ; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2600-2607, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.042>

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92-102, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C.. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 983-992, 2010. <https://doi.org/10.1002/jctb.2391>

ROCHA, G. J. D. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003>

RODRIGUES, P. O.; PEREIRA, J. D. C.; DOS SANTOS, D. Q.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 173-181, 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.031>

RODRIGUES, P. O.; DOS SANTOS, B. V.; COSTA, L.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453 – 459, 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.055>

RODRÍGUEZ, M. A. R. *et al.* An LCA based indicator for evaluation of alternative energy routes. **Applied Energy**, v. 88, p. 630-635, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.08.013>

RYABOVA, O.; VRŠANSKÁ, M.; KANEKO, S.; ZYL, W. H.; BIELY, P. A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. **Febs Letters**, v. 583, n. 9, p.1457-1462, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.057>

SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCHETTINI, S. B. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 221 – 227, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>

SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; DE OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903-910, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140393>

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. L.; COLODETTE, J. H.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SIQUEIRA, F. G. *et al.* The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.002>

SOTO, M. L.; DOMINGUEZ, H.; NUNES, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, v. 49, n. 1, p. 53-59, 1994. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90173-2)

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes. **Comunicado Técnico 07**. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento – MAPA. Aracajú – SE, 2002. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/download/CMT07.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2016.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.02.002>

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

THANGAVELU, S. K.; AHMED, A. S.; ANI, F. N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 56, p. 820-835, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.089>

TOIVOLA, A. *et al.* Alcoholic Fermentation of deuterium-xylose by yeasts. Washington: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.

TOQUERO, C.; BOLADO RODRIGUES, S. Effect of four pretreatment on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68-76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.090>

TRAJANO, H. L.; WYMAN, C. E. Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*, p. 103-128, 2013. <https://doi.org/10.1002/9780470975831.ch6>

TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M., COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment; effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology** v. 133, p. 332-339, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>

VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, p. 1-22, 2017. <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0017>

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource technology**, v. 36, n. 1, p. 3-14, 1991. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90095-2)

WYMAN, C. E. *et al.* Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, v. 1, p. 1023-1062, 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420030822.ch43>

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307-319, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00163-X)

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319 – 338, 2014.

Chang ZHOU, J.; WANG, Y. H. ; CHU, J.; LUO, L. Z.; ZHUANG, Y. P.; ZHANG,S. L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 819-825, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.068>

ZHU, J.; WAN, C.; LI, Y. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7523-7528, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.060>

CAPÍTULO 2

(Capítulo referente ao artigo publicado na Revista *Applied Biochemistry and Biotechnology* – disponível no Apêndice B)

Uso de extrato hemicelulolítico produzido por consórcio entre espécies de *Aspergillus* na sacarificação de sorgo biomassa

2.1 INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos são fontes atraentes para a produção de etanol em todo o mundo, uma vez que são renováveis e amplamente disponíveis (SALADINI *et al.*, 2016). Neste sentido, resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de sorgo sacarino, palha de arroz, palha de trigo e palha de milho se destacam (THANGAVELU *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017). Culturas energéticas de rápido crescimento e alta produtividade, como o sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], também podem ser adequadas como fontes de energia, tanto na forma de amido e sacarose como de lignocelulose (CARRILLO *et al.*, 2014).

O sorgo é uma cultura adaptável a diferentes condições de cultivo e pode ser utilizado tanto para obtenção de etanol 1G (etanol de primeira geração) quanto etanol 2G (CARRILLO *et al.*, 2014). No Brasil, pesquisas voltadas para a geração de variedades energéticas com elevada composição em biomassa vêm sendo conduzidas. Como exemplo, o Programa de Melhoramento Genético do Sorgo na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Milho e Sorgo), em colaboração com a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), recentemente desenvolveram um tipo de sorgo com maior conteúdo em biomassa, chamado *sorgo biomassa* – SB (PARRELLA *et al.*, 2011). Na avaliação de 62 genótipos de sorgo biomassa melhorados geneticamente, foram obtidos teores de celulose entre 32,38 a 49,87%, hemicelulose entre 16,40 a 28,20% e lignina entre 6,77% a 10,96% (ZHAO *et al.*, 2009; MAY *et al.*, 2014), assemelhando-se a outras fontes convencionalmente utilizadas para a produção de etanol 2G, como o bagaço de cana-de-açúcar (BC). No entanto, SB apresentou menor teor de lignina e elevada composição de polissacarídeos (hemiceluloses e celulose) quando comparado a BC (MAY *et al.*, 2014). Por esta razão, SB pode ser um material de alto potencial para a geração de etanol celulósico (DEMIRBAS, 2003; HORST, 2017).

Para a sua utilização na fermentação alcoólica, primeiramente, esses materiais devem ser submetidos a processos de sacarificação com enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) para a liberação de açúcares fermentescíveis. Coquetéis de enzimas comerciais têm sido empregados em procedimentos de hidrólise, acarretando um alto custo ao processo. Celulases e hemicelulases podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), empregando-se substratos lignocelulósicos para o crescimento microbiano e indução da produção enzimática (CHANDEL *et al.*, 2011). Fungos filamentosos, por serem os microrganismos mais adaptados ao desenvolvimento nesses substratos, têm sido amplamente estudados para a produção de enzimas por FES (YOO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2016; ALFENORE; MOLINA-JOUVEA 2016). Em estudos realizados recentemente, algumas cepas de *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* foram consideradas boas produtoras de enzimas do complexo hemicelulolítico e celulolítico, como xilanase, β -xilosidase e β -glicosidase (SANTOS *et al.* 2015; GOMES *et al.* 2016) após crescimento por FES em bagaço de cana (BC) e farelo de trigo (FT). Dessa forma, celulases e hemicelulases produzidas a partir de resíduos lignocelulósicos por FES têm sido utilizadas na etapa da hidrólise na busca de bioconversões eficientes e economicamente viáveis (ZHENG *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Geralmente, antes da hidrólise enzimática, é necessária uma etapa de pré-tratamento para remover a lignina, aumentar a porosidade das fibras e o acesso à celulose (ROCHA *et al.*, 2015). Em seguida, os polímeros são hidrolisados em monômeros de hexoses (C6) e pentoses (C5) e então, submetidos à fermentação alcoólica (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2011). Dessa forma, pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos podem ser utilizados para auxiliar na redução da recalcitrância do material, e assim facilitar a conversão de carboidratos em açúcares fermentescíveis (KUMAR *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017). No entanto, após o pré-tratamento, pode ocorrer corrosão dos reatores e conversão de açúcares em compostos inibidores da sacarificação e do processo fermentativo (CHANDRA *et al.* 2007). A condensação e a precipitação de componentes de lignina solubilizada também podem ocorrer ao final do processo (SANTOS *et al.*, 2012). Assim, apesar de vantajosa, uma etapa de pré-tratamento pode algumas vezes ser onerosa para a bioconversão de biomassas.

Biomassas lignocelulósicas são também constituídas por extrativos contendo ácidos graxos, fenóis, ceras e outros compostos orgânicos, que podem ser extraídos com água ou solventes orgânicos (SANTOS *et al.*, 2012). A presença dos extrativos no material pode dificultar o processo de hidrólise, visto que estes compostos podem diminuir o acesso à fração polissacarídica e consumir a alcalinidade durante o pré-tratamento. Altas concentrações de

extrativos podem também interferir na quantificação da lignina, prejudicando uma caracterização mais precisa dos resíduos. Portanto, é aconselhável que tais compostos sejam removidos do material (SLUITER *et al.*, 2012). Neste contexto, no presente trabalho, um consórcio enzimático produzido pelo co-cultivo de *A. fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1 por FES foi empregado na hidrólise do sorgo biomassa, sem a realização de uma etapa prévia de pré-tratamento. O objetivo foi avaliar a eficiência desse consórcio enzimático comparando o efeito sobre o sorgo biomassa bruto (SB) e após retirada dos extrativos (SE) em relação aos rendimentos em açúcares fermentescíveis e inibidores.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Sorgo biomassa

Amostras de SB da variedade LE299, melhoradas geneticamente para aumentar o teor de biomassa (sensível ao fotoperíodo com ciclo tardio e porte alto) foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Brasil (EPAMIG). O plantio da variedade LE299 foi realizado em maio de 2016 na estação experimental na Usina Capim Branco (Uberlândia, Minas Gerais, Brasil) (figura 13). Após a coleta, o SB foi lavado em água corrente, seco em estufa a 50°C, triturado a 4mm de espessura e em seguida armazenado em local seco à temperatura ambiente para posterior utilização.

Figura 13 - Plantio e Colheita de SB.



Fonte: Diego (2016).

2.2.2 Caracterização do sorgo biomassa

A quantificação e retirada dos extrativos no sorgo biomassa bruto (SB) foi realizada em cartucho especial do tipo Soxhlet, previamente pesado e tarado. Em um balão volumétrico de 500 mL, adicionou-se 125 mL de ciclohexano e 125 mL de etanol (99%) e submeteu-se à extração por 48 horas. Em seguida, o cartucho e a amostra de sorgo foram lavados com água destilada (100 mL). Após a lavagem, o cartucho foi seco a 60°C por 72 horas. Após essa etapa, o sistema cartucho e sorgo biomassa livre de extrativos (SE) foi pesado. Para realização dos cálculos de perda de massa, uma amostra de SE foi retirada e submetida à análise de umidade. O teor de extrativos foi determinado por gravimetria.

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a norma TAPPI T211 OM-93. Cerca de 1,000 g de SB foi adicionado em um cadinho e o conjunto foi aquecido a 800°C em mufla

por 2 horas. A amostra foi então resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. O conteúdo de cinzas foi determinado considerando a percentagem de massa do resíduo (amostra após a calcinação) com relação à massa inicial de amostra seca.

O teor de lignina insolúvel foi determinado segundo a Norma TAPPI T222 OM-02, com pequenas modificações. Pesou-se 0,7133 g (base seca) de SB e SE e transferiu-se para um tubo de 45 mL contendo 10,7 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% ($d = 1,6338 \text{ g mL}^{-1}$). O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente. Para quantificar o teor de lignina solúvel, utilizou-se como amostra o filtrado obtido durante a etapa anterior através da medida de absorbância em 215 nm e 280 nm.

Os teores de celulose e hemiceluloses foram determinados pela análise cromatográfica dos componentes da solução resultante da determinação de lignina Klason através da detecção dos seguintes compostos: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF). As análises dos açúcares foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) modelo SHIMADZU. A mistura foi composta de H_2SO_4 $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e o fluxo do eluente de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida em 45°C em um forno modelo CTO-10A SHIMADZU.

2.2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A produção de enzimas foi realizada por FES utilizando como inóculo um consórcio de fungos mesofílicos das espécies *Aspergillus niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 (Figura 14), previamente isolados de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar e identificados por sequenciamento gênico (SANTOS *et al.*, 2015). Estas linhagens foram crescidas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud estéril a 30°C no Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC - UFU).

Utilizou-se como meio de fermentação, 2,5g de bagaço de cana (BC) e 2,5g de farelo de trigo (FT), acrescidos de 5 mL de solução nutriente, composta por sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_4$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnésio (Mg_2SO_4) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$). A mistura foi autoclavada por 20 minutos e, em seguida, foram adicionados três discos miceliais de cada pré-inóculo e adicionou-se 15 mL de solução nutriente (volume final 20 mL) (figura 15). O processo de FES foi realizado por sete dias a 30°C (figura 16). Após cada 24 horas de cultivo, um volume de 50 mL de água destilada foi adicionado aos frascos para a extração das enzimas, seguido de agitação mecânica em um agitador orbital a

200 rpm durante 1 hora. O material foi filtrado, centrifugado por 30 minutos a 5000rpm e o sobrenadante contendo o extrato enzimático bruto foi alíquotado e armazenado a -20°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 14 – Pré-inóculo de *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 crescendo em consórcio.



Fonte: A autora.

Figuras 15 e 16 - Fermentação em estado sólido e incubação a 30°C.



Fonte: A autora.

2.2.4 Dosagem de enzimas

Após a FES, as atividades de celulases (β -glicosidase e carboximetilcelulase – CMCase) e de hemicelulases (xilanase e β -xilosidase) foram quantificadas. As atividades foram expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco utilizado na FES ($U\ g^{-1}$). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas.

A quantificação de β -glicosidase foi realizada a 60°C utilizando uma mistura de reação contendo 50 μ L de extrato enzimático bruto, 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} ,

pH 5,5 e 250 μ L de ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 4 mmol L⁻¹ (PNPG, Sigma-Aldrich) como substrato. Após 10 minutos, a reação foi interrompida por adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2 mol L⁻¹. A concentração de ρ -nitrofenol liberado (ρ NP) foi determinada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ρ NP por minuto de reação a partir de uma curva padrão de ρ NP (BAFFI *et al.*, 2011).

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), em uma mistura de reação contendo 30 μ L de extrato enzimático bruto e 270 μ L de carboximetilcelulose 1% (CMC, Sigma-Aldrich), respectivamente, preparados em tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 (MILLER, 1959). As reações foram conduzidas a 40°C por 10 minutos e interrompidas pela adição de 300 μ L de DNS. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e o volume final foi completado com 2400 μ L de água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minutos de reação, obtida a partir de uma curva padrão de glicose (RODRIGUES *et al.*, 2017).

A atividade de celulases totais por unidades de papel de filtro (FPU) foi determinada em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão citrato 0,05 mol L⁻¹, pH 4,8, 0,5 mL de extrato enzimático e uma fita de papel de filtro de 1 cm de largura por 6 cm de comprimento, pesando aproximadamente 50 mg (GHOSE, 1987). A reação ocorreu por 60 minutos e após esse período, foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS e o volume final foi homogeneizado e levado ao banho de ebulição por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho de gelo e 20 mL de água destilada foram adicionados e homogeneizados. Após 20 minutos, o papel de filtro foi macerado com bastão de vidro. A quantidade de glicose liberada foi medida a 540 nm (DIAS *et al.*, 2017).

A dosagem de β -xilosidase foi determinada pelo mesmo procedimento para a β -glicosidase, porém, utilizando ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma-Aldrich) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de ρ NP por minuto nas condições de ensaio, a partir de uma curva padrão de ρ NP (Santos *et al.*, 2015). A atividade de xilanase foi quantificada da mesma forma que para CMCase pelo método do DNS, nas mesmas condições (Miller, 1959). No entanto, utilizou-se xilana 1% como substrato enzimático (Sigma-Aldrich). A quantidade de xilose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de xilose por min de reação, a partir da curva padrão de xilose (RODRIGUES *et al.*, 2017).

2.2.5 Hidrólise enzimática do sorgo biomassa

Foram realizadas duas hidrólises, sendo a primeira com sorgo biomassa bruto (SB) e a segunda com sorgo biomassa livre de extrativos (SE). As hidrólises foram realizadas em frascos do tipo erlenmeyer de 50 mL, selados com rolha de borracha em tampão citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 e com volume final de 20 mL, utilizando extrato enzimático obtido na etapa de FES (consórcio *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6) contendo 10 FPU.g^{-1} celulose. A mistura foi incubada a 50°C , a 150 rpm e as amostras foram coletadas após 12 e 24 horas de hidrólise. Todos os hidrolisados foram filtrados, centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata (PEREIRA *et al.*, 2015). As concentrações de açúcares e inibidores liberados nos hidrolisados foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização química do sorgo biomassa

Amostras de sorgo biomassa bruto (SB) e após a retirada dos extrativos (SE) foram caracterizadas quanto aos teores de cinzas, extrativos, lignina, hemiceluloses e celulose (Tabela 1). Os valores obtidos na caracterização química foram comparados com outros estudos. Castro *et al.* (2017) avaliaram a composição química de três cultivares de sorgo sacarino cultivados na Universidade de Flórida e apresentaram valores próximos para lignina (entre 19,6 e 22,2%). Porém, valores divergentes para celulose (entre 42,4 e 44,5%) e hemiceluloses (entre 18,7 e 19,5%) foram encontrados por esses autores. Koradiya *et al.* (2016) também observaram porcentagens diferentes de polissacarídeos: 43,8% de celulose e 24,55% de hemiceluloses. Corredor *et al.* (2009) caracterizaram quatro tipos de sorgos forrageiros para a produção de açúcares fermentescíveis. Dentre esses, todas as quatro variedades de sorgo apresentaram teor de celulose entre 24% a 38%, valores compatíveis com as porcentagens encontradas no presente trabalho, tanto para SB bruto quanto livre de extrativos (SE).

Tabela 1 - Caracterização do sorgo biomassa.

Composição (%)	SB	SE
Cinzas	3,40± 0,11	4,35± 0,10
Extrativos	13,11± 0,08	0,00± 0,12
Celulose	30,72± 0,16	32,11± 0,19
Hemiceluloses	28,49± 0,20	34,66± 0,17
Lignina Insolúvel	21,01± 0,18	19,67± 0,20
Lignina solúvel	3,70± 0,22	2,95± 0,21
Balanço de massa	100,43± 0,10	93,74± 0,16

Fonte: A autora.

Após a retirada dos extrativos, houve pequena redução no teor de lignina (cerca de 7%). Observou-se ainda que a fração polissacarídica foi preservada, com um pequeno aumento, em função da redistribuição das massas (Tabela 1).

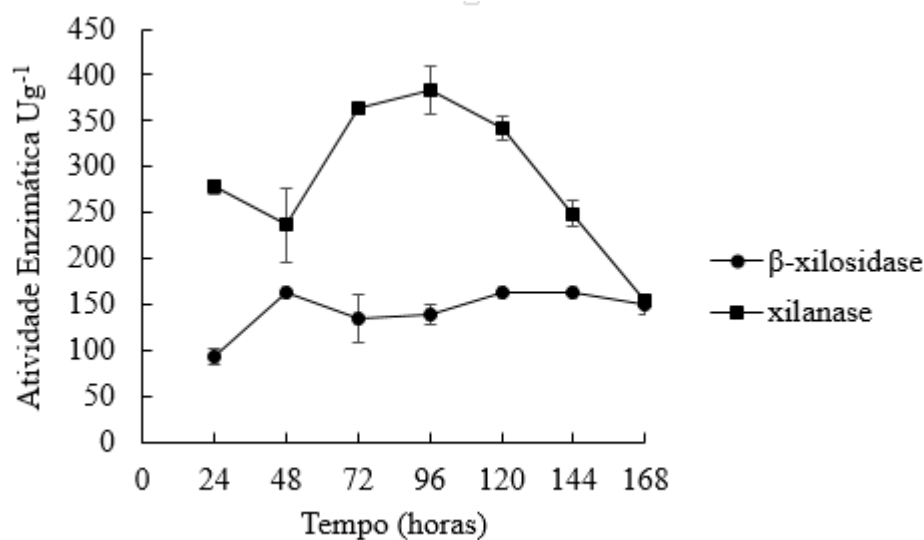
2.3.2 Dosagens de enzimas

As curvas de produção de enzimas celulases (β -glicosidase, CMCase e FPase) e de hemicelulases (β -xilosidase e xilanase) em função do tempo pelo consórcio entre *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 foram avaliadas após a FES, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos (Figuras 17, 18 e 19).

2.3.2.1 Hemicelulases

No presente estudo, foram obtidas atividades significativas para as hemicelulases investigadas (Figura 17). O pico máximo de produção de xilanase foi observado em 96 horas de fermentação (375 U g^{-1}). No período entre 72 e 120 horas, foi observado cerca de 95% de atividade, sendo que a partir de 120 horas houve uma queda acentuada na produção desta enzima. Em estudos anteriores, linhagens de *Aspergillus* foram descritas como boas produtoras de xilanases (MORETTI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015). Lamounier *et al.* (2018) obtiveram máxima produção de xilanase de $544,46 \text{ U g}^{-1}$ em 96 horas de fermentação, também com BC e FT como substratos. Moretti *et al.* (2012) observaram produção máxima de xilanase por *A. fumigatus* M.7.1 de $1040,0 \text{ U g}^{-1}$ em 144 horas de cultivo, utilizando os mesmos substratos. Para β -xilosidase, a produção se manteve alta e constante durante toda a fermentação, com pico máximo em 48 horas (150 U g^{-1}). Rodrigues *et al.* (2017) obtiveram pico de $78,00 \text{ U g}^{-1}$ de β -xilosidase por *A. niger* SCBM1 em 144 horas de FES também com BC e FT nas mesmas proporções. No entanto, o cultivo isolado de *A. fumigatus* SCBM6 não produziu esta enzima. Santos *et al.* (2015) também analisaram a produção de β -xilosidase e xilanase por *A. niger* SCBM3, utilizando os mesmos substratos e obtiveram valores inferiores aos encontrados no presente trabalho (73 e 39 U g^{-1} após 144 e 48 horas de FES, respectivamente). Estes autores

Figura 17 – Produção de hemicelulases por FES por consórcio fúngico (*A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6), utilizando BC e FT como substratos.



Fonte: A autora.

também relataram a produção de β -xilosidase (9 U g^{-1}) e xilanase (19 U g^{-1}) por *A. sydowii* SCBM7 com picos de produção entre 144 e 96 horas, respectivamente. Comparando a produção de β -xilosidase obtida no presente estudo com estudos anteriores, nossos dados mostram que o crescimento de *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 em consórcio foi favorável à indução dessa enzima, com produção bastante alta (150 U g^{-1}) no início da fermentação.

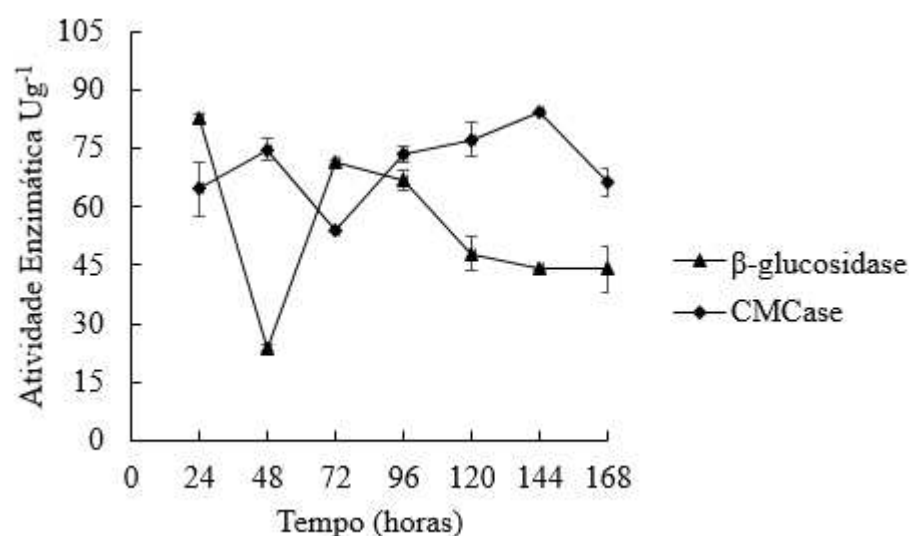
2.3.2.2. Celulases

As curvas de produção de celulases em função do tempo foram avaliadas para β -glicosidase, CMCase e FPase (Figuras 18 e 19). O pico máximo de produção de β -glicosidase foi observado em 24 horas de fermentação (80 U g^{-1}), ocorrendo uma elevada diminuição após 48 horas e após esse período, a atividade voltou a aumentar entre 72 e 96 horas. Em seguida, a atividade caiu novamente. Este resultado pode indicar a presença de duas β -glicosidases no extrato, sendo provavelmente uma produzida por *A. niger* SCBM1 e a outra por *A. fumigatus* SCBM6. No trabalho de Santos *et al.* (2015), utilizando também BC e FT como substratos, três espécies foram selecionadas como boas produtoras de β -glicosidase: *A. sydowii* SBCM7 e *A. niger* SBCM3 exibiram picos máximos de produção em 240 horas de cultivo (60 e 54 U g^{-1} , respectivamente) e *A. fumigatus* SBC4 produziu 54 U g^{-1} após 96 horas, valores inferiores ao encontrado no presente trabalho. Rodrigues *et al.* (2017) avaliaram a produção de β -glucosidase

pelas mesmas linhagens isoladas e nas mesmas condições e observaram produção máxima de 78,47 U g⁻¹, após 120 horas por *A. fumigatus* SCBM6, enquanto que *A. niger* SCBM1 apresentou pico de 43,02 U g⁻¹ em 144 horas. Comparando a produção obtida no presente trabalho com os estudos de Santos *et al.* (2015) e Rodrigues *et al.* (2017), observamos que o crescimento dos fungos em consórcio foi importante para potencializar a produção de β -glicosidase, visto que foi observada uma alta atividade (80 U g⁻¹) logo no início da fermentação (Figura 18). Outros autores também avaliaram a produção da β -glicosidase por estas espécies isoladamente e obtiveram valores inferiores ao encontrado no presente estudo. Moretti *et al.* (2012) observaram produção máxima de β -glicosidase de 5 U g⁻¹ por *A. fumigatus* M.7.1 em 96 horas de cultivo, utilizando também BC e FT como substratos. Bansal *et al.* (2012) avaliaram a produção da β -glicosidase por *A. niger* NS-2 utilizando apenas BC como substrato e obtiveram apenas 3 U g⁻¹ em 96 horas de fermentação. Dessa forma, comparando com estudos anteriores, os dados obtidos sugerem que o cultivo de ambas as espécies em consórcio favoreceu a produção de β -glicosidase.

Para a CMCase o pico de biossíntese foi observado em 144 horas de fermentação (80 U g⁻¹). Basso *et al.* (2010) compararam a produção de CMCase por FES com BC (28°C durante 15 dias) utilizando duas linhagens de *Trichoderma reesei*. A linhagem RUT C30 produziu 3,5 U g⁻¹ e a linhagem QM9414, 5,7 U g⁻¹, valores também inferiores aos obtidos no presente trabalho. Soni *et al.* (2010) cultivaram *A. fumigatus fresenius* AMA em BC e encontraram atividade máxima de 29,2 U g⁻¹ para CMCase, valor também inferior ao obtido nesse estudo. Oliveira *et al.* (2018) utilizaram bagaço de cana, casca de coco verde e bagaço de caju como substrato para a produção de celulasas por *A. fumigatus* 5.8S e observaram que os maiores valores para CMCase foram de 4,20 U g⁻¹ para bagaço de cana-de-açúcar; 4,07 U g⁻¹ para casca de coco e 0,64 U g⁻¹ para bagaço de caju; valores também abaixo ao obtido no presente trabalho.

Figura 18 – Produção de celulases por FES por consórcio fúngico entre *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6, utilizando BC e FT como substratos.

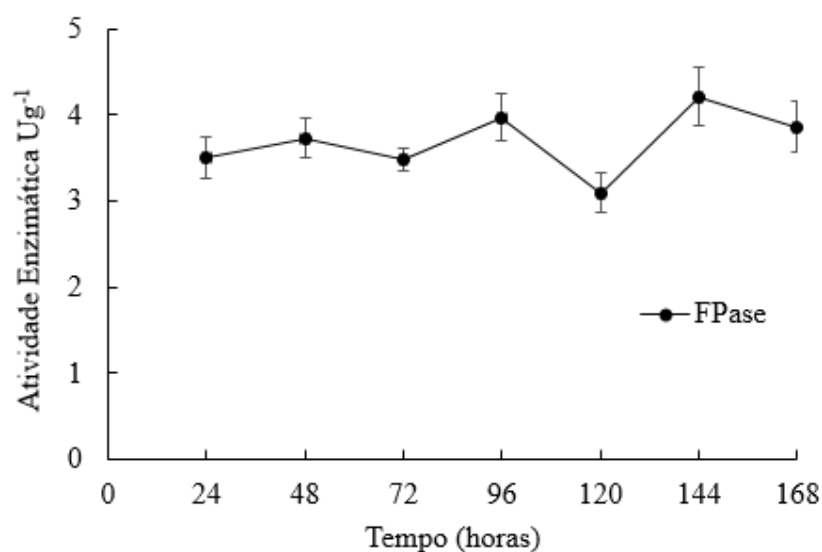


Fonte: A autora.

Quanto à atividade de celulase sobre papel de filtro (FPase), a produção manteve-se constante com pico máximo (4 FPU g⁻¹) em 144 horas de fermentação (Figura 19). Ang *et al.* (2013), em seu trabalho com a linhagem de *A. fumigatus* SK1 cultivada em dendenzeiro, encontraram máxima atividade de 3,36 FPU g⁻¹ em 264 horas de fermentação, valor próximo ao encontrado nesse estudo. Soni *et al.* (2010) estudaram a produção de celulases por *A. fumigatus fresenius* AMA por FES utilizando BC como substrato e observaram 1,43 FPU. g⁻¹; valor inferior ao obtido no presente estudo. Falkoski *et al.* (2013) estudaram a produção de FPase por FES cultivando *Chrysosporthe cubensis* em FT e obtiveram 2,5 FPU.g⁻¹ em 96 horas de fermentação, atividade também inferior ao presente trabalho. Dias *et al.* (2017) em seu trabalho com *Aspergillus niger* SCBM1 encontraram atividade máxima de Fpase de 2,11 FPU g⁻¹ em 144 horas de fermentação usando sorgo biomassa (SB), produção também inferior à obtida nesse trabalho.

Em suma, os resultados indicaram que o crescimento em consórcio das linhagens fúngicas *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 por FES em BC e FT foi favorável à produção de enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas, com produções superiores às encontradas em alguns estudos prévios (ANG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015).

Figura 19 – Produção de FPase por FES por consórcio fúngico entre *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6, utilizando BC e FT como substratos.



Fonte: A autora.

2.3.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma técnica vantajosa, uma vez que as reações são altamente específicas, minimizando a geração de subprodutos indesejáveis (KLINKE *et al.*, 2003). Além disso, evita problemas de corrosão provocada pelo uso de ácidos e fornece bons rendimentos em glicose com baixa formação de subprodutos, favorecendo a utilização do hidrolisado em processos de bioconversão (MARTÍN *et al.*, 2007).

Nesse trabalho, realizou-se a hidrólise enzimática do sorgo biomassa antes e após a retirada dos extrativos (Tabela 2), utilizando o extrato enzimático produzido na etapa anterior (consórcio *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6, contendo 10 FPU. g⁻¹ celulose). Os resultados obtidos indicaram que os extrativos podem influenciar a eficiência da hidrólise enzimática. Na hidrólise utilizando sorgo após a retirada dos extrativos (SE), observou-se um aumento da produção de arabinose, xilose e glicose (Tabela 2). Esse aumento foi mais expressivo (cerca de 10x) na produção de glicose (2,5 g.L⁻¹ em um período de 12 horas de hidrólise). Esse valor foi superior ao encontrado por Pereira *et al.* (2016) na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por ozonólise, utilizando um combinado de enzimas comerciais (Celluclast 1.5 L e Novozym 188) na proporção de 10 FPU e 30 CBU por g de celulose e utilizando também um extrato produzido *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 nas mesmas proporções (0,95 e 1,40 g.L⁻¹, respectivamente). Nascimento *et al.* (2016) realizaram hidrólise enzimática com

10% de BC pré-tratado com NaOH utilizando 20 FPU.g⁻¹ da enzima Accelerase 1500 e obtiveram 38,8 g.L⁻¹ de glicose no hidrolisado, valor muito superior ao encontrado no presente trabalho. No entanto, esses autores utilizaram enzima comercial e o dobro de carga enzimática, o que pode encarecer o processo. Além disso, esses autores utilizaram amostra de bagaço de cana submetido a pré-tratamento alcalino, etapa que também pode aumentar custo do método e, conseqüentemente do produto final.

Tabela 2 - Produção de açúcares e inibidores após hidrólise enzimática de sorgo biomassa bruto (SB) e sem extrativos (SE). Valores expressos em g.L⁻¹.

Compostos	SB		SE	
	12 h	24 h	12 h	24 h
Celbiose	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000
Glicose	0,186± 0,090	0,000± 0,000	2,538± 0,100	0,685± 0,110
Xilose	0,494± 0,080	0,000± 0,000	0,832± 0,110	0,000± 0,190
Arabinose	0,285± 0,230	0,000± 0,270	0,761± 0,190	0,454± 0,210
Ác. fórmico	0,468± 0,090	0,332± 0,050	0,000± 0,000	0,000± 0,000
HMF ^a	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000	0,000± 0,000
FF ^b	0,000± 0,000	0,010± 0,060	0,004± 0,080	0,000± 0,000

^a HMF: 5- Hidroximetil -2-furfuraldeído

^b FF: Furfural

Fonte: A autora

Dessa forma, comparando os resultados deste trabalho com estudos anteriores, conclui-se que a quantidade de glicose liberada após a hidrólise do sorgo biomassa livre de extrativos (SE) foi satisfatória, visto que o material foi submetido somente à retirada de extrativos, sem a necessidade de uma etapa de pré-tratamento. Além disso, foi utilizado um consórcio enzimático produzido por meio do co-cultivo de *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 por fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais (BC e FT), o que também contribui de forma positiva para a diminuição do custo total do processo.

Observou-se ainda que a retirada dos extrativos também representou um fator positivo para a diminuição da formação de compostos inibidores da fermentação alcóolica, como por

exemplo o ácido fórmico (Tabela 2). Estudos anteriores mostraram que os compostos originalmente presentes na fração extrativa, como os ácidos carboxílicos de cadeia curta, podem atuar como inibidores dos processos de hidrólise e fermentação (RABELO, 2010). Assim, o aumento na produção de monossacarídeos (glicose, xilose e arabinose) após a hidrólise de sorgo extraído (ES) pode estar relacionado à retirada de extrativos. Outros compostos como os derivados furânicos (5-hidroximetil-2-furfuraldeído e furfuraldeído) estão entre os compostos inibidores mais importantes da hidrólise (MOREIRA, 2011). Entretanto, neste estudo, esses compostos foram obtidos em quantidades muito baixas, principalmente nos hidrolisados de sorgo biomassa sem extrativos (SE). Neves *et al.* (2016) compararam a composição do bagaço de cana-de-açúcar bruto (NCB) e extraído com etanol (EECB) e observaram que compostos inibidores da hidrólise enzimática, tais como HMF e FF diminuíram consideravelmente na amostra de bagaço de cana livre de extrativos. Esses resultados indicaram que apenas a fase de retirada dos extrativos foi suficiente para favorecer a diminuição da concentração desses compostos.

2.4 CONCLUSÕES

A hidrólise enzimática realizada com sorgo biomassa submetido apenas à retirada de extrativos (SE) apresentou aumento expressivo na produção de glicose, xilose e arabinose, quando comparada com sorgo biomassa bruto (SB). O tempo de hidrólise não influenciou no aumento da produção de açúcares, sendo o tempo de 12 horas o mais adequado para este fim.

Foram obtidos bons rendimentos em açúcares fermentescíveis e baixa formação de inibidores em períodos mais curtos de hidrólise.

REFERÊNCIAS

- ALFERORE, S.; MOLINA-JOUVEA, C. Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. **Bioprocess Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1747-1756, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.028>
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293–1302, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>
- BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; ARDAME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; DE AQUINO, S. F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinary concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137-146, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>
- BAFFI, M. A.; TOBAL, T.; LAGO, J. H. G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. A Novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking. **Journal of Food Science**, v. 76 (7), 2011.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341 – 1346, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana de açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1282-1289, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100008>
- CARRILLO, M. A.; STAGGENBORG, S. A.; PINEDA, J. A. Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. **Fuel**, v. 116, p. 427-431, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.028>
- CASTRO, E.; NIEVES, I. U.; RONDÓN, V.; SAGUES, W. J.; FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M. T.; YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; ERICKSON, J.; VERMERRIS, W. Potential for ethanol production from different sorghum cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 367-373, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.050>
- CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; NARASU, M. L.; Rao, L. V. Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS3. **New Biotechnology**, v.28, n.6, 593–599, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.002>
- CHANDRA, R. P., BURA, R, MABEE, W. E., BERLIN. A., PAN, X. SADDLER. J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocelullosics? **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.67–93, 2007. https://doi.org/10.1007/10_2007_064

CHEN, H; FU, X.; Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468 – 478, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>

CORREDOR, D. Y.; Salazar, J. M.; Hohn, K. L.; Bean, S.; Bean, B.; & Wang, D. Evaluation and characterization of forage sorghum as feedstock for fermentable sugar production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 158, p. 164-179, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8340-y>

DEMIRBAS, A. Relationships between lignin contents and fixed carbon contents of biomass samples. **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 1481–1486, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(02\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(02)00168-1)

DIAS, L. M; DOS SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; BAETA, B. E. L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus Niger* and *A. Fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 708–718, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13672>

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; DE REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.140>

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GOMES, A. F. S.; SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A. Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 915 – 921, 2016.

HORST, D. J. Lignin as alternative fuel: an estimate of the thermal energy generation potential from Brazilian crops. **Environ Prog sustain energy**, v. 36, 2017, p. 717-722. <https://doi.org/10.1002/ep.12441>

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>

KLINKE, H. B.; OLSSON, L.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: Wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology Bioengineering** v. 81, p. 738-747, 2003. <https://doi.org/10.1002/bit.10523>

KORADIYA, M.; DUGGIRALA, S.; TIPRE, D.; DAVE, S. Pretreatment optimization of Sorghum pioneer biomass for bioethanol production and its scale-up. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 142 – 147, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.156>

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment

technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948-3962, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>

LAMOUNIER, K. F. P.; RODRIGUES, P. O.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A.
Saccharification of sugarcane bagasse using an enzymatic extract produced by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Renewable Materials**, v. 6, p. 169-175, 2018.
<https://doi.org/10.7569/JRM.2017.634151>

MARTÍN, C.; ALMAZAN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L. J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **Internacional Sugar Journal**, v. 109, p. 33-39, 2007.

MAY, A.; PARRELLA, R. A. C.; DAMASCENO, C. M. B.; SIMEONE, M. L. F. Sorgo como matéria-prima para produção de bioenergia: etanol e cogeração. **Sorgo: inovações tecnológicas**, v. 35, n. 278, p. 73 – 81, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11245-014-9280-5>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FILHO, E. X. F. Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update. In: Buckeridge, m. s.; Goldman, g. h. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol: Springer New York**, v. 6, p. 73-96, 2011. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92740-4_6

MORETTI, M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RORIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

NASCIMENTO, V. M.; MANRICH, A.; TARDIOLI, P. W.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; DE MORAES ROCHA, G. J.; GIORDANO, R. D. L. C. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, p. 112-125, 2016. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0008>

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.085>

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; DE MACEDO, G. R.; ASEVEDO, E. A.; CARVALHO, V. P.; ARAUJO, F. R. Utilization of agroindustrial residues for producing celulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, p. 937-944, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038>

PARRELA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. Desempenho agrônômico de híbridos de sorgo biomassa. **EMBRAPA Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 41**, p. 21, 2011.
<https://doi.org/10.1111/jam.12757>

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; BRITO DE OLIVEIRA, T.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new

sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, J. C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122–129, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.064>

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

ROCHA, G. J. D. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003>

RODRIGUES, P. O.; PEREIRA, J. D. C.; DOS SANTOS, D. Q.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 173-181, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.031>

SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCHETTINI, S. B. Guidelines for emery evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 221 – 227, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>

SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; DE OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903-910, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140393>

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado, USA: **National Renewable Energy Laboratory** (NREL), 2012. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.007>

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus fresenius strain* (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 277-283, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.007>

THANGAVELU, S. K.; AHMED, A. S.; ANI, F. N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 820 – 835, 2016.

TOMÁS-PEJÓ, E.; ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. **Biofuels**, p. 149-176, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00007-3>

YOO, J.; ALAVI, S.; VADLANI, P., AMANOR-BOADU, V. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v.102, p. 7583-7590, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.092>

ZHAO, Y. L.; DOLAT, A.; STEINBERGER, Y.; WANG, X.; OSMAN, A.; XIE, G. H. Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. **Field Crop Research**, v. 111, p. 55-64, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.10.006>

ZHENG, Y., LEE, C.; YU, C.; CHENG, Y.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J.S. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. **Applied Energy**, v. 105, p.1-7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.070>

CAPÍTULO 3

Pré-tratamentos ácido, básico e com peróxido de hidrogênio alcalino, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de sorgo biomassa

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol 2G envolve a desestruturação da lignocelulose, potencialmente rica em açúcares fermentescíveis na forma de celulose e hemiceluloses que podem ser convertidos em etanol. No entanto, estes polissacarídeos não são prontamente fermentescíveis, e sua despolimerização para liberar as frações de glicose e xilose deve ser obtida a partir da ação de enzimas (CHANDEL *et al.*, 2011).

As biomassas lignocelulósicas são recursos atrativos para a produção de etanol em todo o mundo, uma vez que são renováveis, de baixo custo e amplamente disponíveis (SALADINI *et al.*, 2016). Neste sentido, destacam-se os resíduos agrícolas como bagaço de cana (BC), palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e casca de arroz (THANGAVELU *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.* 2017). No Brasil, por exemplo, a produção de cana-de-açúcar estimada para a safra de 2018/2019 é de 615,48 milhões de toneladas e a área colhida estimada em 8,63 milhões de hectares (CONAB, 2018).

Como alternativa, pesquisas voltadas à geração de variedades energéticas contendo elevada composição de biomassa vêm sendo conduzidas no Brasil (MAY *et al.* 2014). Entre as possibilidades, o sorgo biomassa (SB), desenvolvido por melhoramento genético é um material promissor devido ao seu desenvolvimento vigoroso e rápido e alto índice de biomassa (PARELLA *et al.*, 2011). A composição de SB assemelha-se a outros materiais lignocelulósicos empregados convencionalmente para a produção de etanol celulósico, como o bagaço de cana (BC). No entanto, SB contém menor teor de lignina e composição elevada em polissacarídeos (hemicelulose e celulose) (MAY *et al.* 2014), sendo considerada uma cultura energética muito promissora para a produção de etanol (DEMIRBAS, 2003, HORST, 2017, DIAS *et al.*, 2017).

Os três principais componentes da parede celular vegetal são celulose, hemiceluloses e lignina, sendo a matriz polimérica de carboidratos fortemente reticulada e ligada à lignina. Métodos eficazes de pré-tratamentos são geralmente necessários para romper a matriz heterogênea e aumentar a área de superfície e a porosidade do material, a fim de melhorar a digestibilidade enzimática. No entanto, o efeito de cada pré-tratamento no avanço da estrutura e a geração de possíveis compostos inibitórios varia de acordo com o material utilizado

(LAVARACK *et al.*, 2002; KARAGÖZ *et al.*, 2012). Entre os pré-tratamentos químicos, o pré-tratamento ácido com ácido sulfúrico ou clorídrico (H_2SO_4 ou HCl) foi avaliado com sucesso para hidrolisar hemiceluloses, aumentando a acessibilidade à celulose em diferentes biomassas lignocelulósicas (CHANDEL *et al.*, 2011, ZHENG *et al.*, 2013, MARCOTULLIO *et al.*, 2011). O pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) tem efeito deslignificante, remove as cadeias laterais de xilana, reduz o grau de polimerização da celulose e aumenta a porosidade, aumentando substancialmente a suscetibilidade do substrato ao ataque enzimático (Park *et al.*, 2010, OLIVEIRA *et al.*, 2014). Yu *et al.* (2014), por exemplo, aumentaram notavelmente a liberação de açúcares e produção de bioetanol a partir do bagaço de sorgo sacarino aplicando um pré-tratamento com NaOH à biomassa.

A combinação de reagentes alcalinos e oxidantes também se mostrou altamente eficaz na remoção de lignina e hemiceluloses aumentando o rendimento e liberação de açúcares após a hidrólise enzimática (MONTE *et al.*, 2011). O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) alcalino tem sido aplicado em bagaço de sorgo sacarino (CAO *et al.*, 2012), palha de colza (KARAGÖZ *et al.*, 2012) e cascas de arroz (DÍAZ *et al.*, 2013). Toquero e Bolado (2014) realizaram diferentes pré-tratamentos químicos para palha de trigo e relataram os melhores resultados na hidrólise enzimática ($31,82 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e $13,75 \text{ g.L}^{-1}$ xilose) e produção de bioetanol ($17,37 \text{ g.L}^{-1}$) no material submetido ao pré-tratamento com H_2O_2 . Bolado-Rodríguez *et al.*, (2016) compararam o efeito de quatro pré-tratamentos (autoclavagem térmica, autoclavagem diluída com HCl , autoclave diluída com NaOH e peróxido alcalino) na produção de metano pela digestão anaeróbia de palha de trigo e bagaço de cana (BC) e na produção de compostos inibitórios. Todos os pré-tratamentos liberaram ácido acético e compostos fenólicos, enquanto furfural e HMF foram produzidos somente após pré-tratamento ácido. Por fim, o pré-tratamento com peróxido alcalino desencadeou uma maior inibição da hidrólise no bagaço de cana do que na palha de trigo.

A viabilidade econômica do etanol lignocelulósico está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação, isto é, nos índices quantidades de açúcares efetivamente transformados em etanol (UNREAN E NHUNG, 2013). As tecnologias de fermentação em desenvolvimento têm realizado com êxito a fermentação de hexoses (C6) provenientes da celulose. No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de fermentar a fração de pentoses (C5) oriunda das hemiceluloses, que corresponde a aproximadamente 40% do total do açúcares derivados da biomassa. Em função disso, leveduras fermentadoras de pentoses têm sido amplamente investigadas (NAKAMURA *et al.*, 2001; HAMACHER *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; SLININGER *et al.*, 2014). A partir dos anos 80, novas

espécies de leveduras capazes de fermentar a xilose começaram a ser descritas, como *Candida shehatae*, isolada de solo (Du Preez; Van Der Walt, 1983; VALINHAS, 2016). Desde então, várias espécies de leveduras vêm sendo estudadas para fermentação de xilose, dentre estas, destacam-se *Sheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) e *Spathaspora arboriae* que foram isoladas a partir de madeira em decomposição (KRAHULEC *et al.* 2012; BRITO, 2016) e *Spathaspora passalidarum*, isolada do intestino de besouros que se alimentam de madeira (BRITO, 2016). Neste contexto, a levedura *S. stipitis* tem se apresentado como um microrganismo promissor devido à sua capacidade de fermentar tanto pentoses (xilose e arabinose) como hexoses (glicose, celobiose, galactose e manose), com rendimentos e produtividades relativamente elevados, porém, apresenta baixa tolerância ao etanol acumulado (LAPLACE *et al.*, 2001; ROUHOLLAH *et al.*, 2007; JEFFRIES *et al.*, 2009; SILVA, 2012; FARIAS *et al.*, 2014).

Com base nesses estudos anteriores, o presente trabalho teve como objetivo comparar o efeito de três pré-tratamentos (ácido, básico e peróxido alcalino) na hidrólise enzimática do sorgo biomassa (SB) e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir dos hidrolisados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Sorgo biomassa (SB) da variedade LE299, melhorada geneticamente para aumentar o teor de biomassa (sensível ao fotoperíodo com ciclo tardio e porte alto) foi fornecido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Brasil (EPAMIG). Esta variedade encontra-se em processo de testes e análises para patente. O plantio foi realizado em maio de 2016 na estação experimental na Usina Capim Branco (Uberlândia, Minas Gerais, Brasil).

Sorgo biomassa foi lavado em água corrente, seco em estufa a 50° C, triturado em liquidificador para diminuição do tamanho das partículas e armazenado em local seco à temperatura ambiente para posterior utilização. Em seguida, foi encaminhado via correio aéreo para Universidade de Valladolid (Valladolid, Espanha), onde realizou-se a caracterização e os experimentos de pré-tratamentos, hidrólises e fermentação no período entre 10 de abril a 10 de outubro de 2017, sob a supervisão da Profa. Dra. Silvia Bolado.

3.2.2 Retirada dos extrativos

A retirada dos extrativos foi realizada utilizando o Aparelho de Extração Soxlet e vasos de cristais com cartuchos de celulose específicos. Os vasos de cristais foram mantidos durante 4 horas na estufa a 105°C. Em seguida, foram retirados e mantidos durante 10 minutos no dessecador. Pesou-se separadamente os vasos de cristais e os cartuchos de celulose e acrescentou 1,5g de sorgo dentro de cada cartucho. Acrescentou-se 80mL de água deionizada em cada vaso de cristal e tampou-se os cartuchos de celulose com algodão. Os cartuchos foram colocados no aparelho em posição de imersão sob pressurização a 200°C durante três etapas de 30, 60 e 40 minutos. Após a retirada do material do aparelho extrator o material foi colocado na estufa para secar o sorgo. Esse procedimento foi realizado em triplicata (TRAVAINI *et al.*, 2013).

A análise dos açúcares dos extrativos foram realizadas de acordo com Toquero e Bolado, (2014) e a análise das proteínas dos extrativos foi realizada de acordo com Kjeldahl (1883).

Os lipídeos presentes nos extrativos foram analisados utilizando 0,1g de sorgo acrescidos de 0,1g de óxido de alumínio (Al_2O_3) e 2mL de uma solução de clorofórmio/metanol na proporção 2:1, sob agitação a 4.000 rpm por 5 minutos (este processo foi realizado 2 vezes).

Em seguida, foram acrescentados 3mL de HCl a 37% 0,1N e 0,3 mL de Mg(Cl₂) a 0,5%, deixando em repouso sob a bancada durante 10 minutos a fim de promover a separação entre as fases sólida e líquida (KOCHERT., 1978).

3.2.3 Pré-Tratamentos

Três diferentes pré-tratamentos (PTs) de sorgo biomassa foram avaliados nesse estudo: ácido (PTA), básico (PTB) e peróxido alcalino (PTPA).

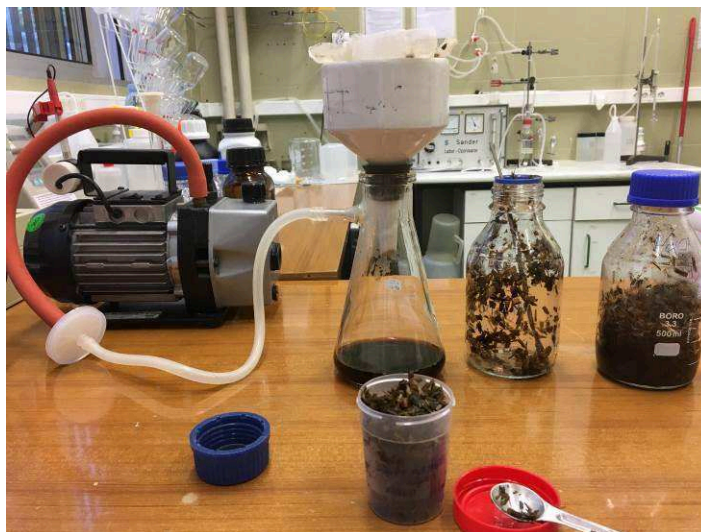
3.2.3.1 Pré-tratamento Ácido

No pré-tratamento ácido (PTA), 10% de matéria seca que corresponde a 21,33 g de sorgo foram pesados e suspensos em soluções de HCl em concentrações de 0,34 e 1,5% até completar o volume final (200 mL). Os ensaios foram realizados em frascos fechados de borosilicato com capacidade de 250 mL. Os frascos foram submetidas à autoclave durante 1 hora sob pressão de 1 atm e a 120°C (BOLADO-RODRIGUES *et al.*,2016). Após o pré-tratamento, ao atingir a temperatura ambiente, a pasta resultante foi recuperada e o sólido residual foi separado por filtração a vácuo utilizando gaze como filtrante até a remoção do líquido. Da fração sólida, utilizou-se 0,5g para determinar o peso seco em estufa a 105°C por 24 h. O restante do sorgo úmido foi pesado e armazenado em refrigerador. As frações sólidas e líquidas do pré-tratamento foram posteriormente utilizadas para caracterização química e hidrólise enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.3.2 Pré-tratamento Básico

No pré-tratamento básico (PTB), 10% de matéria seca (21,33 g de sorgo) foram suspensos em uma solução de NaOH 1,0 e 2,0%. Para cada concentração, os ensaios foram realizados em garrafas fechadas de borosilicato de 250 mL em autoclave durante 1 hora sob pressão de 1atm e a 120°C (BOLADO-RODRIGUES *et al.*, 2016). Ao final dos PTs, após a abertura da autoclave, os frascos foram acomodados em bancadas para resfriamento natural. Após atingirem temperatura ambiente, o sólido residual foi separado por filtração a vácuo até a remoção do líquido (Figura 20). Utilizou-se também 0,5g de sorgo úmido para avaliação do peso seco. As frações sólidas e líquidas foram posteriormente utilizadas para caracterização química e hidrólise enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 20 - Pré-tratamento com NaOH



Fonte: A autora.

3.2.3.3 Pré-tratamento com Peróxido Alcalino

No pré-tratamento com peróxido alcalino (PTPA), 5% de matéria seca (10,6g de sorgo) foi acondicionada em frascos de borosilicato e ressuspensa em solução de H_2O_2 (5,0 e 7,36 %) até completar o volume final de 150 mL. O pH foi ajustado para 11,5 e a mistura foi colocada em agitador rotatório a 120 rpm e 50° C por 60 minutos (BOLADO-RODRIGUES *et al.*, 2016). Anterior à agitação, adicionou-se anti-espumante (Antifoam-Emulsion/Sigma). Após agitação, a solução foi filtrada em bomba a vácuo utilizando gaze para a separação da fração sólida e líquida. O material foi armazenado em refrigerador e utilizado para caracterização química e hidrólise enzimática. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.4 Caracterização do sorgo biomassa

A composição química do sorgo *in natura* e após os pré-tratamentos em termos de carboidratos estruturais e lignina foram determinados segundo Sluiter *et al.*, (2012), com pequenas modificações.

Para a caracterização de SB, 0,3g de massa seca foram adicionados em um erlenmeyer de 125 mL. Dentro da capela, acrescentou-se 3mL de H_2SO_4 72%. Os frascos de erlenmeyers foram vedados com papel alumínio e submetidos à agitação orbital a 200 rpm, durante 1 hora a 30°C. Este processo foi denominado hidrólise ácida forte. Após a agitação em temperatura

constante, foram acrescentados 84 mL de água destilada, iniciando o processo de hidrólise ácida fraca em autoclave a 120°C durante 1 hora. Após ser retirado da autoclave, o material resultante foi filtrado a vácuo em papel de filtro de 0,22 µm possibilitando a separação das fases sólida e líquida (Figura 21).

Figura 21 - Material retirado da autoclave para posterior filtração a vácuo.



Fonte: A autora.

A parte sólida (lignina) foi lavada três vezes com água fervente e filtrada a vácuo. A quarta lavagem foi realizada com água fria para que a lignina se desprendesse das paredes do funil. O papel de filtro contendo a lignina foi adicionado a 105°C na estufa por 24 horas ininterruptas. Após esse período, foi realizada determinação de peso seco da massa resultante, representativo de lignina ácida insolúvel (LAI). A parte líquida resultante do filtrado foi fracionada, sendo a parte líquida utilizada na quantificação da lignina ácida sóluvel (LAS) por espectrofotometria (Spectrophotometer U-2000 HITACHI), com leitura em 240nm. A parte líquida foi filtrada em membranas de filtro (filter lab. 0,22 µm) e os açúcares presentes foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.5 Hidrólise Enzimática

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos em frascos de erlenmeyers de 100 mL contendo o sorgo úmido obtido de cada pré-tratamento. As hidrólises foram realizadas utilizando os coquetéis enzimáticos Celluclast 1,5 L (fonte de celulase) e Novozym 188 (fonte de β-glucosidase), contendo 10 FPU (unidade de hidrólise de papel de filtro - FPase) e 30 CBU

(unidade de celobiase ou β -glicosidase) por grama de celulose (base seca), a partir das dosagens das atividades enzimáticas de FPase e β -glicosidase nos coquetéis enzimáticos.

De acordo com cada PT realizado (PTA, PTB, PTPA), foi calculada a quantidade de sorgo úmido pré-tratado que foi empregada nas hidrólises. Esses cálculos se basearam na quantidade de matéria seca após os PTs, no grau de solubilização do sorgo durante os PTs e no cálculo do fator de correção da hidrólise enzimática, onde para a realização das hidrólises utilizou-se: para PTA: 7,0g de sorgo úmido (HCl 0,34%) e 6,8g de sorgo úmido (HCl 1,5%); para PTB: 7,4 g de sorgo úmido (NaOH 1,0%) e 7,5 g de sorgo úmido (NaOH 2,0%) e para PTPA: 7,5g de sorgo úmido (H₂O₂ 5,0%) e 7,3g de sorgo úmido (H₂O₂ 7,36 %). A essas respectivas quantidades de sorgo úmido foram acrescentados 15 mL de água destilada e 1,25 mL de tampão citrato de sódio com concentração final de 0,05M. Foi realizada a correção do pH das soluções até atingir 4,8, utilizando soluções de NaOH 6M ou HCl 6M. Em seguida, adicionou-se 320 μ L de uma mistura da enzima Celluclast com Novozym 188 (contendo 10 FPU.g⁻¹ e 30 CBU.g⁻¹ de celulose) para cada hidrólise. O material foi completado com água destilada até atingir volume final de 25 mL. A hidrólise foi realizada a 50°C e 300 rpm durante 48 h. Os hidrolisados foram filtrados em filtros de 0,22 μ m de porosidade e armazenados sob refrigeração para posterior análise de açúcares e compostos inibitórios. Os experimentos foram realizados em triplicata (TRAVAINI *et al.*, 2013).

Figura 22 - Hidrólise enzimática do sorgo biomassa.



Fonte: A autora.

3.2.6 Fermentação Alcoólica

3.2.6.1 Microorganismo e meio de crescimento

A fermentação dos hidrolisados foi realizada com a levedura *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), obtida da Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, armazenada em freezer a -80°C . Cepas de *P. stipitis* foram crescidas em placas de Petri contendo meio ágar YEPX estéril (10g.L^{-1} de extrato de levedura, 20g.L^{-1} de peptona, 20g.L^{-1} de xilose e 20g.L^{-1} de agar) durante 24 horas a 30°C (Figura 23).

Para a preparação do pré-inóculo, colônias de *P. stipitis* foram cultivadas aerobicamente a 175 rpm e 30°C durante 24 horas em meio YEPX líquido previamente esterilizado em autoclave (TOQUERO E BOLADO, 2014).

Figura 23 - Crescimento de *P. stipitis* em placas de petri.



Fonte: A autora.

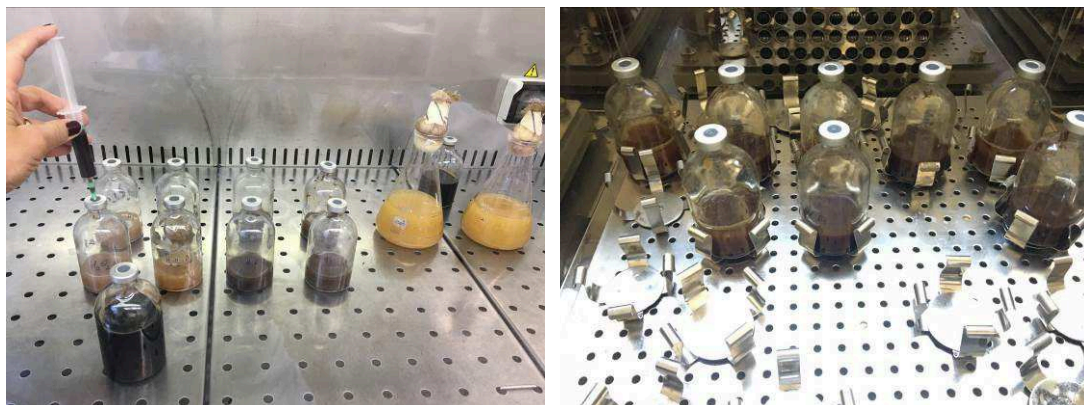
3.2.6.2 Fermentação alcoólica com solução modelo e hidrolisados reais

A solução modelo foi composta por 25g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de xilose e suplementada com soluções de sais contendo 20g.L^{-1} de peptona, 10g.L^{-1} de extrato de levedura, $12,8\text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,51\text{g}$ de Na_2HPO_4 , $0,47\text{g}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,45\text{g}$ de MgSO_4 , $11,81\text{g}$ de ácido succínico e $4,27\text{g}$ de NaOH (TOQUERO e BOLADO, 2014).

A solução modelo e os hidrolisados produzidos na etapa anterior foram transferidos separadamente para frascos de penicilina de 100 mL e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Após a autoclavagem, adicionou-se 5 mL da solução de sais e 3 mL de pré-inóculo previamente crescido por 24 horas, seguido de incubação por 168 horas a 175 rpm e 30°C

(TOQUERO e BOLADO, 2014. Para a fermentação com os hidrolisados reais, os hidrolisados foram transferidos para frascos de penicilina de 100 mL e acrescidos de 5 mL de soluções de sais e 3 mL de pré-inóculo de *P. stipitis* e a incubação ocorreu nas mesmas condições definidas para a solução modelo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 24 - Preparo da fermentação dos hidrolisados.



Fonte: A autora

Após as fermentações, as amostras foram filtradas a vácuo com papel de filtro e centrifugadas por 10 min a 10.000rpm para a separação dos sólidos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 μm de porosidade e então analisados por cromatografia para quantificação de etanol (TRAVAINI *et al.*, 2016).

3.2.7 Métodos analíticos

Glicose, xilose, etanol, ácido oxálico, ácido fórmico e ácido acético foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (CLAE). O cromatógrafo utilizado foi o Waters Alliance 2695 com uma coluna Phenomenex RezexTM RP MMonosacarídeo 300x7,8 mm a 80°C com água MiliQ como eluente a um fluxo de 0,6 mL/min, equipado com um detector de índice de refração (BOLADO-RODRÍGUES *et al.*, 2016). O conteúdo total dos compostos fenólicos (TPC) na fração líquida resultante de cada pré-tratamento foi determinado pelo Método Folin (SINGLETON *et al.*, 1999), medido em espectrofotômetro a 765 nm, utilizando ácido gálico como padrão de calibração.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização do sorgo biomassa

As frações de SB *in natura* e pré-tratadas foram caracterizadas quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e ligninas (lignina ácida insolúvel, lignina ácida solúvel e lignina total). A xilana foi considerada como representativo das hemiceluloses por ser o componente majoritário desse polissacarídeo.

Após a caracterização química, o sorgo biomassa bruto (SB) apresentou 35,77% de celulose, 12,52% de hemiceluloses (xilana) e 28,47% de lignina total. Após os diferentes pré-tratamentos em diferentes concentrações, observou-se um aumento considerável nas porcentagens de celulose e hemicelulose (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química (%) do sorgo biomassa bruto (SB) e após pré-tratamentos (PT).

	¹ LAI	² LAS	³ LT	Celulose	Xilana	**Balanço de massa
SB bruto	23,48 ± 0,20	4,98 ± 0,16	28,47 ± 0,04	35,77 ± 1,04	12,52 ± 0,31	98,83 ± 0,10
PT NaOH (1%)	17,97 ± 0,53	8,24 ± 0,82	26,21 ± 1,36	44,62 ± 2,75	26,40 ± 1,82	97,235 ± 0,15
PT NaOH (2%)	16,73 ± 0,21	6,49 ± 0,41	23,23 ± 0,63	39,56 ± 0,16	23,17 ± 0,95	85,96 ± 0,24
PT HCl (0,34%)	17,67 ± 0,38	7,42 ± 0,22	25,10 ± 0,61	46,35 ± 0,17	18,91 ± 0,12	90,36 ± 0,57
PT HCl (1,5%)	18,85 ± 0,86	6,39 ± 0,02	25,24 ± 0,83	49,73 ± 2,29	15,00 ± 0,36	89,97 ± 0,78
PT H₂O₂ (5%)	23,37 ± 0,01	5,95 ± 0,53	29,33 ± 0,54	44,08 ± 0,44	19,12 ± 0,17	92,53 ± 0,51
PT H₂O₂ (7,36%)	4,29 ± 0,00	5,32 ± 0,31	9,62 ± 0,31	44,63 ± 0,11	18,79 ± 0,01	73,04 ± 0,81

¹Lignina ácida insolúvel; ²Lignina ácida solúvel; ³Lignina total

**O balanço de massa (em base seca) foi realizado somando LT, celulose, xilana. Para o sorgo bruto também foi acrescentado cinzas (4,46%) e extrativos (17,61%).

Fonte: A autora

Após o pré-tratamento alcalino com NaOH (PTA), observou-se uma pequena redução na concentração de lignina ácida insolúvel (LAI) sendo uma redução de 23,48% para o PT com NaOH a 1% e 28,74% para o PT com NaOH a 2% e um aumento de 65% na concentração de lignina ácida solúvel (LAS) no PT NaOH 1% e de 30,32% para o PT NaOH 2%. As frações de celulose e xilana aumentaram em 24 e 110% (PT NaOH 1%) e 10 e 85% (PT NaOH 2%) após a redistribuição das massas. Esse aumento na concentração de celulose pode ser devido à remoção de parte da lignina, visto que a redução deste componente faz com que ocorram

alterações na distribuição dos outros componentes nas fibras (RODRIGUES, 2017). Estes dados indicaram que o pré-tratamento alcalino não foi eficiente na remoção da lignina, porém manteve as concentrações de celulose e hemiceluloses (xilana). Outros estudos reportaram redução mais significativa no conteúdo de lignina após PT de bagaço de cana com NaOH. Guilherme *et al.* (2015) obtiveram 75,77% de redução do conteúdo de lignina utilizando o PT com NaOH 4% a temperatura de 121° C durante 30 minutos e Maryana *et al.* (2014) obteve 57% de redução da lignina após utilizar o PT com NaOH IN com tempo de aquecimento do reator de 45 minutos, a 100°C.

O PT com HCl (PTA) a 0,34% promoveu uma pequena redução do conteúdo de lignina total (11,83%) com aumento em celulose e xilana. Porém, esse aumento de celulose foi ainda mais acentuado no PT com HCl (1,5%) com cerca de 39% e o PT HCl (0,34%) promoveu maior aumento de xilana (51%). Toquero e Bolado (2014) em seus estudos com palha de cana encontraram um aumento de 70,0% na porcentagem de celulose, devido à diminuição drástica de 76,8% na composição de hemicelulose causada pela alta solubilização da xilose após este PT. Esse aumento no conteúdo de celulose foi acima ao encontrado no presente trabalho. Em uma pesquisa realizada com bagaço de sorgo sacarino após o PT HCl (1,39%), a 120°C durante 46,67 minutos, quase toda a hemicelulose foi removida, representando apenas 2,53% da composição final na celulignina ácida. Já os conteúdos em celulose e lignina, aumentaram de 40,42 e 19,79% na composição inicial para 45,78 e 27,79%, respectivamente, após este pré-tratamento, indicando um aumento proporcional destas frações devido à grande solubilização da fração hemicelulósica (BARCELOS, 2012).

O PT com H₂O₂ alcalino a 7,36% promoveu uma drástica diminuição do conteúdo de lignina total, em um total de 66,2%. Houve ainda um aumento de 24% de celulose e 51% de xilana. Rabelo *et al.* (2011) aplicando PT com H₂O₂ a 7,35% em bagaço de cana obtiveram uma redução de 86% de lignina total e uma redução de 70,5% de hemiceluloses. A porcentagem de celulose manteve-se praticamente constante. Esse mesmo tipo de PT proporcionou um aumento de 38,8% na composição de celulose, um aumento de 13,3% na porcentagem de hemiceluloses e uma redução de 16,5% na composição da LAI por Toquero e Bolado (2014) em bagaço de cana-de-açúcar. Esse mesmo método foi aplicado à palha de colza por Karagöz *et al.* (2012), que relataram um leve aumento de 14,7% na composição de celulose e uma diminuição de 18,0 e 21,1% em hemiceluloses e lignina. Com base nestes dados, concluiu-se que, entre os pré-tratamentos realizados, o PT com H₂O₂ alcalino a 7,36% foi o mais eficiente na remoção de lignina e preservação da fração polissacarídica.

Com relação ao total de extrativos presentes no sorgo biomassa bruto, SB apresentou um total de 17,61% de extrativos. Estes compostos correspondem à presença de taninos, pigmentos, alcalóides, óleos, essenciais, resinas, graxas, lipídeos, proteínas e açúcares. O conteúdo de açúcares encontrado em SB está apresentado na Tabela 4. Entre os açúcares presentes, observou-se uma maior concentração de glicose, correspondendo a cerca de 59% dos açúcares encontrados nesta fração. Encontrou-se ainda 2,25% de lipídeos e 0,217g de proteínas/g de extrativo nesta fração.

Tabela 4 - Análise dos açúcares dos extrativos

Açúcares	g.L⁻¹
Glicose	24,1286
Xilose	11,9121
Arabinose	5,4619

Fonte: A autora.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC) nas biomassas utilizadas para a produção de etanol 2G tem grande importância visto que durante o pré-tratamento, esses compostos podem ser gerados e atuar como inibidores tanto da hidrólise enzimática quanto da fermentação dos açúcares a etanol (MOREIRA, 2013). A Tabela 5 mostra a quantificação dos compostos fenólicos que podem ter sido gerados durante os PTs. De acordo com essa tabela, encontrou-se uma maior concentração de compostos fenólicos nas amostras de sorgo após o PT ácido. Para os demais PTs, obteve-se valores de concentrações bem próximos.

Tabela 5 - Conteúdo total dos compostos fenólicos (TPC).

PT	TPC (mg.L⁻¹)
NaOH (1%)	309,373
NaOH (2%)	337,716
HCl (0,34%)	492,516
HCl (1,5%)	436,046
H ₂ O ₂ (5%)	336,091
H ₂ O ₂ (7,36%)	309,868

Fonte: A autora.

Alvira *et al.* (2013) obtiveram $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ de fenóis totais em hidrolisados de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor. Toquero e Bolado (2014) encontraram maiores concentrações de fenóis ($3,4 \text{ g.L}^{-1}$) em palha de trigo pré-tratada com NaOH. Esses valores encontrados nestes trabalhos anteriores estão bem acima ao encontrado no presente estudo. Durante a hidrólise enzimática do material lignocelulósico pré-tratado, ocorrem modificações na estrutura da lignina, expondo alguns compostos fenólicos que têm um efeito inibitório na conversão enzimática da biomassa holocelulósica (DUARTE *et al.*, 2012). Desta forma, um ponto crucial para a hidrólise da biomassa é reduzir a inibição e a desativação causada por compostos fenólicos, de forma a aumentar a taxa de hidrólise e reduzir a carga enzimática utilizada. Portanto, esses resultados indicaram que a baixa quantidade de inibidores fenólicos gerados após os diferentes PTs foi um resultado positivo dos pré-tratamentos para a próxima etapa de hidrólise.

3.3.2 Hidrólise Enzimática

Os conteúdos em glicose e xilose após as hidrólises realizadas tanto para sorgo biomassa bruto (SB) quanto para sorgo extraído (SE) e após os pré-tratamentos (PTs) estão apresentados na Tabela 6.

Os dados obtidos mostraram uma diferença significativa nas concentrações de glicose no hidrolisado utilizando sorgo extraído (SE) quando comparado com o hidrolisado utilizando sorgo bruto (SB), com um grande aumento na concentração de glicose em SE. Esse aumento na concentração de glicose também foi bastante expressivo nos hidrolisados previamente submetidos a pré-tratamentos, principalmente nas amostras de sorgo submetidos a PTs com HCl e H_2O_2 , em todas concentrações (Tabela 6). Comparando o hidrolisado de sorgo biomassa sem extrativos (SE) com os hidrolisados de sorgo pré-tratado (PT), observou-se que os melhores rendimentos em glicose foram após as hidrólises utilizando-se sorgo pré-tratado com HCl a 1,5% e H_2O_2 a 7,36%, com um aumento de 120% e 118% nas concentrações de glicose, respectivamente (Tabela 6). Com relação à liberação de xilose após as hidrólises, observou-se que as concentrações de xilose se mantiveram praticamente as mesmas nos hidrolisados de SB quanto para SE. No entanto, nos hidrolisados de sorgo pré-tratado, foi obtido um grande aumento na concentração de xilose quando também sorgo pré-tratado com HCl e H_2O_2 alcalino foi utilizado nas hidrólises. Esse aumento nas concentrações de xilose nos hidrolisados de PT com HCl 0,34% e PT com H_2O_2 5% foi ainda mais expressivo.

Tabela 6 - Rendimentos em glicose e xilose após as hidrólises enzimáticas do sorgo biomassa.

Hidrolisados	glicose		xilose	
	g.L ⁻¹	%	g.L ⁻¹	%
SB	0,16	0,75 ± 0,19	0,69	8,69 ± 1,5
SE	8,49	32,60 ± 0,79	0,7	7,67 ± 0,01
PT NaOH (1%)	10,33	48,15 ± 3,10	2,58	34,28 ± 17,14
PT NaOH (2%)	7,96	37,09 ± 10,21	2,11	28,64 ± 2,90
PT HCl (0,34%)	15,75	73,40 ± 0,75	7,09	94,38 ± 1,46
PT HCl (1,5%)	18,74	85,46 ± 1,8	6,35	84,58 ± 1,7
PT H ₂ O ₂ (5%)	17,73	82,60 ± 0,84	6,9	91,82 ± 4,24
PT H ₂ O ₂ (7,36%)	19,35	90,15 ± 1,27	6,64	88,48 ± 1,4

SB: sorgo biomassa bruto; SE: sorgo biomassa extraído; PT: sorgo biomassa submetido a pré-tratamento (NaOH: básico; HCl: ácido e H₂O₂: peróxido alcalino).

Fonte: A autora.

É importante ressaltar que esse é o primeiro estudo que avalia o sorgo biomassa como matéria prima de hidrólises enzimáticas visando a produção de açúcares fermentescíveis. Portanto, os resultados apresentados foram comparados com outras biomassas lignocelulósicas. Toquero e Bolado (2014) avaliaram quatro tipos de PT (térmico, NaOH 1%, HCl 1,5% e H₂O₂ 5%) em palha de trigo e realizaram hidrólise a 50°C por 72 h empregando complexos enzimáticos comerciais (10 FPU de celulase NS50013 e 10 CBU de (β-glucosidase NS50010, Novozymes). Esses autores encontraram porcentagens máximas de glicose em hidrolisados de palha de trigo pré-tratada com H₂O₂ alcalino, com 48,5% e 63,7% de rendimento de glicose para amostras lavadas. Estes autores concluíram que o pré-tratamento de peróxido alcalino foi vantajoso para a retenção de celulose e para abrir a estrutura lignocelulósica, mesmo mantendo concentrações relativamente altas de lignina. Karagöz *et al.* (2012) relataram 15,08 g.L⁻¹ de glicose ao aplicar o mesmo pré-tratamento para palha de colza e Cao *et al.* (2012) obtiveram 10,41 g.L⁻¹ de glicose com hidrolisados de bagaço de sorgo doce submetido a pré-tratamento peróxido alcalino. Em ambos os casos, as concentrações de glicose foram inferiores às obtidas neste estudo. As concentrações de xilose obtidas após as hidrólises com HCl e H₂O₂ alcalino no presente trabalho foram superiores às obtidas por Cao *et al.* (2012) que obtiveram 4,98g.L⁻¹ de xilose e levemente inferior ao encontrado por Karagöz *et al.* (2012) que observaram 8,29g.L⁻¹ de xilose após o PT.

Dentre os PTs avaliados, o PT com NaOH foi o que proporcionou menor aumento nas concentrações de glicose e xilose, sendo o melhor resultado com o hidrolisado de sorgo pré-

tratado com 1% de NaOH (10,33 g.L⁻¹ de glicose e 2,58 g.L⁻¹ de xilose). Esse resultado foi inferior ao encontrado por outros autores com outras biomassas. Nascimento *et al.* (2016) realizaram hidrólise enzimática com 10% de bagaço de cana pré-tratado com NaOH utilizando 20 FPU.g⁻¹ da enzima Accelerase 1500 e obtiveram 38,8 g.L⁻¹ de glicose no hidrolisado. Cao *et al.* (2012) obtiveram 12,55 g.L⁻¹ de glicose e 4,98 g.L⁻¹ de xilose em hidrolisados de bagaço de sorgo doce usando PT alcalino.

De acordo com os resultados observados, o PT com H₂O₂ alcalino (7,36%) mostrou-se o método mais promissor visto que foi o PT onde a maior liberação de glicose foi obtida após a hidrólise enzimática. Nesse trabalho, utilizou-se 5% de matéria seca, conforme metodologias estabelecidas pelo grupo de pesquisa da Universidade de Valladolid, na Espanha. No entanto, nossos dados indicaram que estudos complementares serão necessários para otimizar as condições de processo a fim de se obter rendimentos ainda mais expressivos em glicose e xilose. Uma das alternativas seria aumentar a porcentagem de massa seca na hidrólise. Andrade *et al.* (2017) demonstraram que alterações simultâneas em parâmetros importantes na hidrólise enzimática, como tempo e método de pré-tratamento, bem como o conteúdo em sólidos totais podem influenciar diretamente no rendimento final do processo.

3.3.3 Concentração de inibidores em hidrolisados

Pré-tratamentos químicos de biomassas podem gerar compostos de degradação com notável efeito de inibição do processo fermentativo. Esta é uma restrição importante na produção de álcool a partir de material lignocelulósico devido às quedas na fermentação do hidrolisado, ou o alto custo e complexidade dos estágios de desintoxicação (TRAVANI *et al.*, 2013). As quantidades e os tipos de inibidores formados durante o pré-tratamento dependem da composição da biomassa, do tipo de pré-tratamento, e das condições de reação (PANAGIOTOU; OLSSON, 2007, KUMAR; WYMAN, 2009).

Os compostos inibitórios encontrados após cada PT avaliado no presente trabalho estão representados na Tabela 7. De acordo com os dados obtidos, nos hidrolisados de amostras de sorgo biomassa pré-tratado com NaOH obteve-se pequenas concentrações de ácido oxálico e ácido fórmico e houve uma maior formação de ácido acético após o PT com NaOH a 2% (1,3 g.L⁻¹). As menores concentrações de todos os inibidores analisados foram obtidas nos hidrolisados de sorgo PT com HCl. No PT com H₂O₂ alcalino, obteve-se concentrações de ácido oxálico bem próximas à encontrada nos hidrolisados de sorgo pré-tratado com NaOH. A baixa

concentração de ácido acético e ácido fórmico pode indicar uma baixa influência dos efeitos tóxicos destes compostos ao crescimento das leveduras e conseqüentemente, à inibição da fermentação (RODRIGUES, 2017).

As maiores concentrações de ácido fórmico foram encontradas no hidrolisado de sorgo biomassa pré-tratado com H₂O₂ alcalino.

Tabela 7 - Concentração de inibidores nos hidrolisados (g.L⁻¹).

Pré-tratamento	Ácido Oxálico	Ácido Fórmico	Ácido Acético
NaOH (1%)	0,5365	–	0,2421
NaOH (2%)	0,5069	–	1,3084
HCl (0,34%)	0,1170	–	0,5908
HCl (1,5%)	0,2742	0,1089	0,5959
H₂O₂ (5%)	0,4418	0,4677	0,8069
H₂O₂ (7,36%)	0,5575	0,5741	0,8387

Fonte: A autora.

Toquero e Bolado (2014) encontraram 3,59 g.L⁻¹ de ácido acético e 2,06 g.L⁻¹ de ácido fórmico em hidrolisados de palha trigo usando PT com NaOH. Bolado-Rodrigues (2016) encontraram 4,3 g.L⁻¹ de ácido acético em bagaço de cana pré-tratado com NaOH. Esses valores encontrados por esses autores estão acima dos encontrados no presente trabalho. O ácido acético é um produto de degradação de hemiceluloses tipicamente encontrado em hidrolisados, formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemiceluloses. A sua presença no meio fermentativo ocasiona um aumento no consumo de ATP pela levedura. Assim, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (BARAL; SHAH, 2014). Logo, a presença de altas concentrações de ácido acético é indesejável para uma boa eficiência fermentativa.

Ainda comparando as concentrações de ácido fórmico nos hidrolisados de SB após o PT com H₂O₂ alcalino com o estudo de Toquero e Bolado (2014), esses autores encontraram uma concentração de ácido fórmico um pouco acima (0,62 g.L⁻¹) à encontrada no presente trabalho. O ácido fórmico é formado quando o 2- furfuraldeído (FF) e o 5-hidroximetil -2- furfuraldeído (HMF) são decompostos após o pré-tratamento com peróxido alcalino (PALMQVIST; HANH-HAGERDAL, 2000). O ácido fórmico eventualmente produzido pode ser removido juntamente com os extrativos e contribuir positivamente para o aumento na produção de glicose e xilose. Com base nesses dados, conclui-se que os hidrolisados obtidos no

presente trabalho apresentaram características favoráveis para fermentação alcoólica, uma vez que foram observadas baixas concentrações de inibidores em comparação com estudos anteriores.

Outros compostos inibitórios comuns referenciados nos pré-tratamentos principalmente de bagaço de cana-de-açúcar, como FF e HMF não foram avaliados nesse experimento, em função da baixa quantidade obtida em estudos anteriores com bagaço de cana previamente submetido aos mesmos tipos de pré-tratamentos (TOQUERO E BOLADO, 2014, TRAVAINI *et al.* 2016).

Após a análise dos resultados das hidrólises, optou-se em realizar fermentações alcólicas somente com os hidrolisados que obtiveram maiores rendimentos em glicose e xilose. Portanto, realizou-se fermentações com os hidrolisados de sorgo biomassa pré-tratados com HCl e H₂O₂.

3.3.4 Rendimentos em etanol após a fermentação

A Tabela 8 mostra a produção de etanol após 168 h de fermentação de hidrolisados de sorgo biomassa pré-tratados. A fermentação alcoólica com *Sheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) utilizando a solução modelo (25 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de xilose) obteve uma produção de 12 g.L⁻¹ de etanol com um rendimento de 30%. Já nas fermentações empregando os hidrolisados pré-tratados, as maiores concentrações de etanol foram observadas após as fermentações dos hidrolisados pré tratados com HCl 0,34% (3,84 g.L⁻¹) e com HCl 1,5% (3,61 g.L⁻¹), correspondendo a 16,15 e 14,62% de rendimento, respectivamente. (Tabela 8). Apesar de a produção de glicose no hidrolisado de sorgo PT com HCl 0,34% não ter sido a mais alta, em comparação com PT com HCl 1,5% e H₂O₂ alcalino em ambas concentrações (Tabela 6), este hidrolisado foi o que obteve maior concentração de xilose, o que pode justificar a maior produção de etanol a partir desta amostra. Além disso, o hidrolisado de sorgo biomassa PT com HCl 0,34% foi o que apresentou a menor formação de inibidores de forma geral, sendo que ácido fórmico não foi detectado e ácido oxálico e ácido acéticos foram encontrados em menores concentrações (Tabela 7). Portanto, o hidrolisado de sorgo biomassa PT com HCl 0,34% foi selecionado como a melhor condição para a produção de etanol por *P. stipitis* em função da maior concentração de xilose e menor produção de inibidores.

Pereira *et al.* (2016) obtiveram 3,15 g.L⁻¹ de etanol após fermentação com *S. cerevisiae* de hidrolisado contendo 10% de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por ozonólise, submetido à hidrólise prévia com 10 FPU/30CBU de Celluclast 1.5 L e Novozym 188, por 48 horas. Cao

et al. (2012) obtiveram 0,89 g.L⁻¹ de etanol a partir de hidrolisados de bagaço de sorgo doce termicamente pré-tratado e 5,55 g.L⁻¹ de etanol a partir de hidrolisados de bagaço de sorgo doce submetido a pré-tratamento térmico seguido de alcalino com 2% de NaOH. Esses estudos anteriores com outras biomassas mostraram valores de rendimento em etanol próximos ou abaixo ao encontrado no presente estudo.

Tabela 8 - Produção de etanol após fermentação alcoólica com *P. stipitis*.

	Etanol (g.L⁻¹)	Rendimento (%)
Solução modelo	12,02 ± 0,08	30,0± 0,00
PT HCl (0,34%)	3,84 ± 0,16	16,15 ± 0,14
PT HCl (1,5%)	3,61 ± 0,04	14,62 ± 0,49
PT H₂O₂ (5%)	2,91 ± 0,49	11,87 ± 2,25
PT H₂O₂ (7,36%)	2,36 ± 0,03	9,09 ± 0,15

Fonte: A autora

Vale ressaltar ainda que, no presente trabalho utilizou-se somente a levedura *Pichia stipitis* nos experimentos de fermentação alcoólica. Porém, estudos prévios apontam resultados superiores com outras espécies de leveduras na fermentação, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais comumente empregada (BON *et al.* 2008, MATSUSHIKA 2009, CHU; LEE, 2007, BARBOSA, 2017). Portanto, conclui-se que os rendimentos em etanol foram satisfatórios sendo que, até o momento, não foram encontrados estudos na literatura demonstrando a utilização do sorgo biomassa para produção de etanol 2G, sendo este estudo, portanto, pioneiro nessa área de investigação.

3.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que os pré- tratamentos com HCl e H₂O₂ alcalino do sorgo biomassa foram os mais favoráveis na preservação dos polissacarídeos, menor formação de inibidores e maior produção de glicose e xilose por hidrólise enzimática e posterior fermentação em etanol. A porcentagem de massa seca utilizada para determinados pré- tratamentos, a concentração dos compostos químicos utilizados nos pré- tratamentos, a levedura empregada na fermentação e o tempo de fermentação são fatores importantes que requerem estudos adicionais a fim de determinar as melhores condições para obtenção de maiores rendimentos em etanol. Os dados obtidos sugerem que o sorgo biomassa pode ser uma matéria prima promissora para hidrólises enzimáticas de biomassa lignocelulósica e que a levedura *Pichia Stipitis* apresenta potencial para fermentar hidrolisados de sorgo biomassa em etanol.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram obtidas quantidades significativas de CMCase, β -glicosidase e β -xilosidase por meio do crescimento das linhagens *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 em consórcio por fermentação em estado sólido (FES).
- A retirada dos extrativos no sorgo biomassa (SE) representou um fator positivo para o aumento nos rendimentos em glicose e xilose após as hidrólises utilizando o consórcio enzimático produzido por FES.
- Com a retirada dos extrativos, observou-se uma diminuição da formação de compostos inibidores, sugerindo apenas esta etapa foi um fator importante para aumentar a eficiência da hidrólise do sorgo biomassa.
- As amostras de sorgo biomassa submetido a diferentes PTs também apresentaram baixas concentrações de inibidores.
- Entre os pré-tratamentos realizados, o PT com H_2O_2 alcalino a 7,36% foi o mais eficiente na remoção de lignina e preservação da fração polissacarídica.
- As maiores concentrações de glicose e xilose foram obtidas nos hidrolisados previamente submetidos a pré-tratamentos com HCl e H_2O_2 alcalino.
- Foram obtidos bons rendimentos em etanol a partir de hidrolisados de sorgo biomassa PT com HCl e H_2O_2 alcalino, após fermentação com a levedura *P. stipitis* comparando com a solução modelo.
- O PT com HCl a 0,34% foi o mais eficiente na produção de xilose, menor formação de inibidores e maior produção de etanol.
- Os dados obtidos indicam que o sorgo biomassa é um material com potencial para utilização na produção de etanol 2G.

- Estudos futuros devem ser realizados a fim de aumentar os rendimentos em etanol, como por exemplo, realizar fermentações dos hidrolisados empregando a levedura *S. cerevisiae* em diferentes intervalos de tempo ou ainda realizar experimentos de co-fermentação com ambas as espécies de leveduras.

REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P.; MORENO, A. D.; IBARRA, D.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M. Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high-substrate loadings. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 74-82, 2013. <https://doi.org/10.1002/btpr.1666>
- ANDRADE, L. P.; CRESPIM, E.; OLIVEIRA, N.; CAMPOS, R. C., TEODORO, J. C.; GALVÃO, C. M A.; MACIEL FILHO, R. Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 75-8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.081>
- BARAL, N. R.; SHAH, A. Microbial inhibitors: formation and effects on acetonebutanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9151-9172, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6106-8>
- BARBOSA, G. M. P. **Avaliação do Potencial de Leveduras Selvagens para a Fermentação Alcoólica De D-Xilose**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.
- BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol**. 2012. 334 p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; TOQUERO, C.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; TRAVAINI, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. **Bioresource. Technology**, v. 201, p. 182-190, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.047>
- BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. *In*: BOM, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 241-271, 2008.
- BRITO, P. L. **Fermentação do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê (*Elaeis guineensis*) tratado com diferentes métodos de destoxificação**. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Biocombustíveis, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.
- CAO, W.; SUN, C.; LIU, R.; YIN, R.; WU, X. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 215-221, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.034>
- CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; NARASU, M. L.; Rao, L. V. Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-

cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS3. **New Biotechnology**, v.28, n.6, 593–599, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.002>

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425-441, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.04.001><https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.04.001>

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v.5, n.3, Brasília: Conab, 2018. 71p. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 20 fev. 2019.

DIAS, L. M.; DOS SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; BAETA, B. E. L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus Niger* and *A. Fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 708–718, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13672>

DÍAZ, A.; TOULLEC, J. L.; BLANDINI, A.; ORY, I.; CARO, I. Pretreatment of rice hulls with alkaline peroxide to enhance enzyme hydrolysis for ethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 949-954, 2013.

DEMIRBAS, A. Relationships between lignin contents and fixed carbon contents of biomass samples. **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 1481-1486, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(02\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(02)00168-1)

DU PREEZ, J. C.; VAN DER WALT, J. C. Fermentation of D-xylose to Ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 357-362, 1983. <https://doi.org/10.1007/BF01141138>

DUARTE, G. *et al.* Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012. <https://doi.org/10.3390/app2040754>

FARIAS, D.; ANDRADE, R. R.; MAUGERI, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. **Applied. Biochemistry Biotechnology**, v.172, n. 1, p. 361-79, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0546-y>

FERREIRA, A. D.; MUSSATO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, S. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. **Yeast**, v. 28, p. 547-554, 2011. <https://doi.org/10.1002/yea.1858>

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. V.; FERNANDES, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 23-33, 2015. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146>

HAMACHER, T. *et al.* Characterization of the xilose-transporting properties of yeast hexosetransporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2783>

JEFFRIES, T.W.; VAN VLEET, J. R. H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 793-807, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>

KARAGOZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapessed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and Co-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 349-357, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.075>

KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. **Liste Chemischer Fachzeitschriften**, v. 22, p. 366 – 383, 1883.

KOCHERT G. Quantitation of the Macromolecular Components of Microalgae, in Handbook of Phycological Methods. **Physiological and Biochemical Methods**, J. Hellebust and S. Cragie (Eds.), Cambridge University Press, London, 189, 1978.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 457-467, 2009. <https://doi.org/10.1002/bit.22068>

LAPLACE, J. M. *et al.* Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* – oxygen requirement as key factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 158-162, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00164412>

LAVARACK, B. P.; GRI, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 13, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00066-1)

MARCOTULLIO, G.; KRISANTI, E.; GIUNTOLI, J.; JONG, W. Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl₃ solutions under mild conditions. X-ray and thermo-gravimetric analysis of the solid residues. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5917-5923, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.092>

MARYANA, R. *et al.* Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v. 47, p.250-254, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.221>

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2392-2398, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.047>

MAY, A.; PARRELLA, R. A. C.; DAMASCENO, C. M. B.; SIMEONE, M. L. F. Sorgo como matéria-prima para produção de bioenergia: etanol e cogeração. **Sorgo: inovações tecnológicas**, v. 35, n. 278, p. 73 – 81, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11245-014-9280-5>

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment

with alkaline peroxide. **Applied Energy**, v. 88, p. 403-408, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.08.009>

MOREIRA, L. R. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus***: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. Tese (Doutorado) Universidade de Brasília, 2013.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 586-592, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.416.abs>

NASCIMENTO, V. M. *et al.* Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, p.112-125, 2016. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0008>

OLIVEIRA, L. R. M.; Nascimento, V. M.; Gonçalves, A. R.; Rocha, G. J. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1-7, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.037>

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibitors and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2007. <https://doi.org/10.1002/bit.21100>

PARRELA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. Desempenho agrônômico de híbridos de sorgo biomassa. **EMBRAPA Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 41, p. 21, 2011.

PARK, J. Y.; SHIROMA, R.; AL-HAQ, M. I.; ZHANG, Y.; IKE, M.; ARAI-SANO, Y.; IDA, A.; KONDO, M.; TOKUYASU, K. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6805-6811, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.098>

PEREIRA, J. C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122–129, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.064>

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, R. R. ; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2600-2607, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.042>

RODRIGUES, P. O.; DOS SANTOS, B. V.; COSTA, L.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453 – 459, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.055>

RODRIGUES, R. G. **Diversidade microbiana cultivável em processo industrial de produção de etanol**. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química e Biológica) -Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

ROUHOLLAH, H. *et al.* Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae* and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their co-cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1110-1114, 2007.

SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCHETTINI, S. B. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 221-227, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.032>

SINGLETON, V. I.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; LOMONT, J. M.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-xylose. **Biotechnology. and Bioengineering**, 2014. <https://doi.org/10.1002/bit.25215>

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado, USA: *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 2012.

THANGAVELU, S.K.; AHMED, A. S.; ANI, F. N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 56, p. 820-835, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.089>

TOQUERO, C.; BOLADO S. Effect of four pretreatment on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68-76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.090>

TRAVAINI, R.; BARRADO, E.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 150-158, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.102>

TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M., COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment; effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology** v. 133, p. 332-339, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>

UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 169, 2013, p. 1895-1909. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0100-y>

VALINHAS, R. V. **Isolamento, seleção e identificação de leveduras selvagens com capacidade para conversão de xilose a etanol**. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Biocombustíveis, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.11.020>

YU M.; LI, J.; LI, S.; DU, R.; JIANG, Y.; FAN.; ZHAO, G.; CHANG, S. A cost-effective integrated process to convert solid-state fermented sweet sorghum bagasse into cellulosic ethanol. **Applied Energy**, v.115, p.331-336, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.11.020>

ZHENG, Y., LEE, C.; YU, C.; CHENG, Y.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J.S. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. **Applied Energy**, v. 105, p.1-7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.070>

APÊNDICE A – EQUAÇÕES DE CONVERSÃO

Caracterização do sorgo biomassa

A conversão em porcentagem (%) de glicose e xilose foi calculada pela seguinte equação:

$$C\% (glicose) = \frac{m_{(glicose)} \times fc}{m_{(amostra)}} \times 100 \quad \text{eq. (1)}$$

Onde:

$m_{(glicose)}$ = massa de glicose em gL^{-1}

$m_{(amostra)}$ = massa seca da amostra usada na caracterização do sorgo bruto e do sorgo pré-tratado

fc = fator de conversão, sendo 0,087

A conversão em porcentagem (%) de xilose foi calculada com auxílio da equação 2:

$$C\% (xilose) = \frac{m_{(xilose)} \times fc}{m_{(amostra)}} \times 100 \quad \text{eq. (2)}$$

Onde:

$m_{(xilose)}$ = massa de xilose em gL^{-1}

$m_{(amostra)}$ = massa seca da amostra usada na caracterização do sorgo bruto e do sorgo pré-tratado

fc = fator de conversão, sendo 0,087

Hidrólise Enzimática

Foram realizadas as conversões enzimáticas em % de glicose e xilose para o sorgo bruto e sorgo pré-tratados de acordo com as equações 3 e 4.

$$CE\% (glicose) = \left(\frac{m_{(glicose)} \times Vf_{(hidrólise)}/1000}{m_{(amostra)} \times (\%glicose/100)} \right) \times 100 \quad \text{eq. (3)}$$

Onde:

$m_{(glicose)}$ = massa de glicose liberada, em gL^{-1}

$m_{(amostra)}$ = massa seca usada na caracterização do sorgo bruto e do sorgo pré-tratado, sendo 1,5g

$Vf_{(hidrólise)}$ = volume final da hidrólise

$$CE\% (xilose) = \left(\frac{m_{(xilose)} \times Vf_{(hidrólise)} / 1000}{m_{(amostra)} \times (\%xilose / 100)} \right) \times 100 \quad \text{eq. (4)}$$

Onde:

$m_{(glicose)}$ = massa de xilose liberada, em gL^{-1}

$m_{(amostra)}$ = massa seca usada na caracterização do sorgo bruto e do sorgo pré-tratado, sendo 1,5g

$Vf_{(hidrólise)}$ = volume final da hidrólise

Rendimento de Etanol

O cálculo do rendimento em etanol foi obtido pela equação 5.

$$Rendimento (\%) = \left(\frac{etanol (gL^{-1})}{glicose (gL^{-1}) + xilose (gL^{-1})} \right) \times 100 \quad \text{eq. (5)}$$