



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

JOÃO GABRIEL BASTOS DE CARVALHO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ULTRASSÔNICO EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

FORTALEZA, CE

2025

JOÃO GABRIEL BASTOS DE CARVALHO

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ULTRASSÔNICO EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA, CE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C324e Carvalho, João Gabriel Bastos de.

Efeito do pré-tratamento ultrassônico em resíduos agroindustriais para liberação de açúcares fermentescíveis / João Gabriel Bastos de Carvalho. – 2025.
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Pré-tratamento ultrassom. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Material lignocelulósico. 4. Biocombustível.
I. Título.

CDD 661

JOÃO GABRIEL BASTOS DE CARVALHO

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ULTRASSÔNICO EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 23/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Dayana Pinto Meneses
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico a:

Minha avó, Maria de Fátima Santos de
Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho desenvolvido e conhecimento adquirido sempre contou com ajuda de diversas pessoas durante a graduação e sou grato por isso. Por isso, gradeço:

Primeiramente à minha mãe Andrea Mara Bastos, ao meu pai Charles Ramon Santos de Carvalho e a minha família que sempre apoiou e acreditou nos meus objetivos.

A minha orientadora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, por sua orientação, revisões e pela oportunidade de realização de estágio em seu laboratório.

As outras participantes da banca examinadora Dra. Marjory Lima Holanda Araújo e Dra. Dayana Pinto de Meneses pela participação, tempo, e valiosas contribuições.

Agradeço também a Maria de Fátima Matos de Freitas Sales pelos ensinamentos, sugestões e confiança dedicada a mim durante o estágio. A Dayana pelas sugestões, contribuições. A Isabele e João Lucas pelo apoio. Aos colegas de laboratório e integrantes do grupo de pesquisa GPBio, especialmente, Ravenna Casemiro, Laiza Brito, Allison e Ticiane e aos outros colegas do grupo pelos ensinamentos, companhia e momentos descontraídos.

Aos colegas de turma e curso, especialmente Levi, Yandra, Iannah, Thaís, Lorena Silva, Hector e tantos outros pelos momentos compartilhados durante essa jornada da graduação. Aos colegas do projeto de extensão do curso de Biotecnologia, LiNAbiotec, pela sua relevância na minha formação durante a graduação.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos e dedicação, a Universidade pelo apoio, principalmente com projetos de bolsas que possibilitaram a permanência do curso durante os anos da graduação.

Aos meus amigos da vida, fora da universidade, especialmente, Eric, Ruth, Maria Isabel, Letícia, Gabriel Henrique, Manuela, Kawan, Ana Beatriz, Hellen, Cristiano e muitos outros pelos momentos descontraídos durante esses anos.

“Não sei nenhum momento da história em que
a ignorância foi melhor que o conhecimento”
(Neil deGrasse Tyson).

RESUMO

A crescente demanda por fontes de energia sustentáveis impulsiona a busca por alternativas renováveis. Nesse contexto, a utilização de resíduos agroindustriais, ricos em carboidratos estruturais e comumente descartados, para a produção de biocombustíveis surge como uma alternativa promissora. Composto por cascas, partes de frutas e verduras possuem açúcares unidos em longas cadeias de celulose e hemicelulose, cercadas por lignina, o que dificulta sua disponibilidade para microrganismos fermentadores produtores de biogás. Diante disso, torna-se necessário o uso de pré-tratamentos que favoreçam a conversão desses polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação do pré-tratamento ultrassom de ponteira, seguido de hidrólise enzimática, para a liberação de açúcares fermentescíveis. Foram testados seis tempos de ultrassom (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), sendo o tratamento de 10 minutos, aliado à ação das enzimas celulase (Celluclast) e alfa-amilase, resultou na maior liberação de glicose (18.494,73 mg/L) e xilose (13.665,22 mg/L). No entanto, essa mesma condição apresentou também os maiores teores de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, compostos potencialmente inibidores do processo de digestão anaeróbia. Conclui-se que o ultrassom é um método eficiente de pré-tratamento para promover a liberação de açúcares a partir de resíduos lignocelulósicos, embora o controle da formação de inibidores seja necessário.

Palavras-chave: Ultrassom; Pré-tratamento; Resíduos agroindustriais; Material lignocelulósico; biocombustível.

ABSTRACT

Given the increasing demand for sustainable energy sources drives the search for renewable alternatives. In this context, the use of agro-industrial residues, rich in structural carbohydrates and commonly discarded, to produce biofuels as a promising alternative. Composed of peels and parts of fruits and vegetables, these residues contain sugars bound in cellulose and hemicellulose chains, which hinders their availability to fermentative microorganisms responsible for biogas production. Therefore, it becomes necessary to apply pretreatments that promote the conversion of these polysaccharides into fermentable sugars. This study aimed to evaluate the application of probe type ultrasonic pretreatment, followed by enzymatic hydrolysis, to release fermentable sugars. Ultrasound treatment times were tested of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 minutes. The conditions of ultrasonic time as 10 minutes combined with enzymatic hydrolysis using the cellulase (Celluclast) and alpha-amylase resulting in the highest concentration of glucose (18,494.73 mg/L) and xylose (13,665.22 mg/L). However, this same condition showed the concentrations of hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural, which are potentially inhibitory compounds in the anaerobic digestion process. It is concluded that ultrasound is an effective pretreatment method for promoting sugar release from lignocellulosic residues, although controlling the formation of inhibitors is necessary.

Keywords: Ultrasound; Pretreatment; Agro-industrial residues; Lignocellulosic material; Biofuel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Compostos constituintes dos materiais lignocelulósico	16
Figura 2	Estrutura e ligações intramoleculares e intermoleculares da molécula de celulose	17
Figura 3	Regiões amorfa e cristalina das fibras celulósicas	17
Figura 4	Principais açúcares e ácidos que formam a hemicelulose	18
Figura 5	Estrutura típica da hemicelulose	19
Figura 6	Estrutura química da Amilose e Amilopectina presentes no amido	20
Figura 7	Representação esquemática da estrutura de pectinas	21
Figura 8	Espectro sonoro	28
Figura 9	Sistema do tipo sonda para aplicação de ultrassom de potência	29
Figura 10	Ilustração da formação, crescimento e colapso das microbolhas durante o processo de cavitação ultrassônica	30
Figura 11	Representação esquemática da ação sinergística das celulases	32
Figura 12	Estrutura da xilana com destaque na atuação da xilanase para liberação de xilose	34
Figura 13	Classificação das enzimas aminolíticas	35
Figura 14	Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)	40
Figura 15	Fluxograma das etapas experimentais	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Concentração de açúcares redutores no resíduo pré-tratado por ultrassom	45
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais técnicas de pré-tratamento em resíduos lignocelulósico para a produção de biogás	23
Tabela 2	Composição do Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)	39
Tabela 3	Volume de enzimas adicionado por ensaio	44
Tabela 4	Atividade das enzimas utilizadas	45
Tabela 5	Concentração de glicose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	47
Tabela 6	Concentração de xilose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	48
Tabela 7	Concentração de celobiose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	49
Tabela 8	Concentração de ácido acético após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	50
Tabela 9	Concentração de hidroximetilfurfural (HMF) após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	51
Tabela 10	Concentração de furfural após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min)	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMG	Amilo-glucosidase
CEASA	Central de Abastecimento de Alimentos do Ceará
CH ₄	Gás Metano
DP	Grau de Polimerização
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HMF	Hidroximetilfurfural
RFV	Resíduo de Frutas e Verduras
RPM	Rotações Por Minuto
SONAR	Sound Navigation and Ranging
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

$^{\circ}$ C Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Caracterização do problema e justificativa	14
1.2	Material lignocelulósico	15
1.2.1	<i>Celulose</i>	16
1.2.2	<i>Hemicelulose</i>	18
1.2.3	<i>Lignina</i>	19
1.2.4	<i>Amido</i>	20
1.2.5	<i>Proteínas</i>	20
1.2.6	<i>Pectinas</i>	21
1.3	Pré-tratamentos	22
1.3.1	<i>Métodos químicos</i>	24
1.3.2	<i>Métodos biológicos</i>	25
1.3.3	<i>Métodos físico-químico.....</i>	26
1.3.4	<i>Métodos físicos</i>	27
1.3.5	<i>Ultrassom</i>	28
1.4	Hidrólise enzimática	30
1.5	Tipos de enzimas	31
1.5.1	<i>Celulases</i>	31
1.5.2	<i>Hemicelulases</i>	33
1.5.3	<i>Amilases</i>	35
1.5.4	<i>Pectinases</i>	36
1.6	Enzimas utilizadas no estudo	36
1.6.1	<i>Celluclast</i>	36
1.6.2	<i>Alfa-amilase</i>	36
1.6.3	<i>Complexo enzimático</i>	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Material	39
3.1.1	<i>Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)</i>	39

3.1.2	<i>Enzimas</i>	40
3.2	Descrição geral das etapas experimentais	40
3.3	Métodos	41
3.3.1	<i>Determinação da atividade das enzimas utilizadas</i>	41
3.3.2	<i>Obtenção da amostra padrão RFV</i>	41
3.3.3	<i>Branqueamento</i>	42
3.3.4	<i>Pré-tratamento ultrassom</i>	42
3.3.5	<i>Hidrólise enzimática</i>	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Atividade das enzimas utilizadas neste trabalho	45
4.2	Concentração dos açúcares redutores no resíduo pré-tratado por ultrassom	45
4.3	Concentração dos açúcares e outros compostos após hidrólise enzimática	46
4.3.1	<i>Avaliação da liberação de glicose</i>	47
4.3.2	<i>Avaliação da liberação de xilose</i>	48
4.3.3	<i>Avaliação da liberação de celobiose</i>	49
4.3.4	<i>Avaliação da liberação de ácido acético</i>	50
4.3.5	<i>Avaliação da liberação de compostos inibitórios</i>	51
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema e justificativa.

No século XX, houve um avanço significativo da indústria fundamentada na exploração de combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão, utilizados na produção de uma ampla variedade de produtos, incluindo combustíveis, fármacos, produtos químicos, fibras sintéticas, plásticos, solventes e ceras, entre outros (BENDER, 2000). Desde então, a demanda por esses recursos tem crescido continuamente, impulsionada principalmente pela intensificação da industrialização e pelo aumento da população mundial, fatores que contribuem para o crescimento do consumo energético global (OURIQUE, 2016). No entanto, a queima e o uso intensivo de combustíveis fósseis acarretam impactos ambientais significativos, com destaque para as alterações climáticas e a degradação ambiental generalizada (BACH, 1981). Diante dos efeitos adversos associados ao uso de fontes não renováveis e da limitação de suas reservas, tem-se intensificado, nas últimas décadas, a busca por fontes de energia alternativas, limpas e sustentáveis (ARAÚJO, 2023).

Os biocombustíveis, fontes de energia com caráter renovável e com baixos índices de emissão de poluentes na atmosfera, podem ser classificados em primeira, segunda, terceira e quarta geração de acordo com a matéria-prima utilizada para sua produção (DUARTE, 2022). São considerados de primeira geração biocombustível produzido a partir de plantações de sementes oleaginosas comestíveis (MÜLLER *et al.*, 2023), milho e cana-de-açúcar. Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de resíduos não alimentares, biomassa lignocelulósico, como biomassa agrícola e resíduos florestais (NANDA, 2018). Biocombustíveis de terceira geração são derivados de microrganismos fotossintéticos, como microalgas, com taxas de crescimento rápido e elevado teor de óleo (Ortiz-Martínez *et al.*, 2019). A quarta geração é considerada um campo novo de pesquisa que necessita de estudos para exploração. Seu objetivo é utilizar culturas vegetais com alterações genéticas para captação do Dióxido de Carbono (CO₂) da atmosfera (SYAFIUDDIN *et al.*, 2020).

A utilização de matérias-primas provenientes da produção de alimentos pode provocar um aumento nos preços globais dos alimentos, uma vez que reduz a quantidade disponível para alimentação humana (HAZRAT *et al.*, 2020). A utilização de matérias-primas que não concorram com a produção destinada à alimentação humana surge como uma alternativa, de modo a garantir a viabilidade econômica dos biocombustíveis (DUARTE, 2022).

A produção de biocombustíveis baseadas em material lignocelulósico pode minimizar a dependência energética em combustíveis fósseis, diminuindo – consequentemente – os impactos negativos no meio ambiente (GABRIEL, 2009). Pois todo CO₂ liberado na queima de biocombustíveis é considerado neutro, pois o carbono emitido na combustão foi consumido pelas plantas (SUBRAMANIAM; MASRON, 2020). Além disso, o descarte de resíduos decorrentes das atividades agroindustriais muitas vezes é feito de forma incorreta, levando a poluição do meio ambiente (LIMA, 2021). Com isso, a utilização desse tipo de resíduo para produção de biocombustíveis pode mitigar os impactos ambientais da utilização de combustíveis fósseis e o descarte incorreto.

Resíduos agroindustriais são subprodutos decorrentes das atividades de indústrias que utilizam matéria-prima proveniente da agropecuária. São compostos por cascas, frutas, legumes e outros vegetais, materiais com abundância de celulose e hemicelulose. A quantidade de resíduos agroindustriais gerados sofre variação de acordo com o período anual, a sazonalidade e a área plantada e colhida. Além disso, a agroindústria é um dos seguimentos que mais produz resíduos orgânicos no Brasil. (DONAGEMMA, 2016). Evidenciando o potencial da utilização dessa matéria-prima.

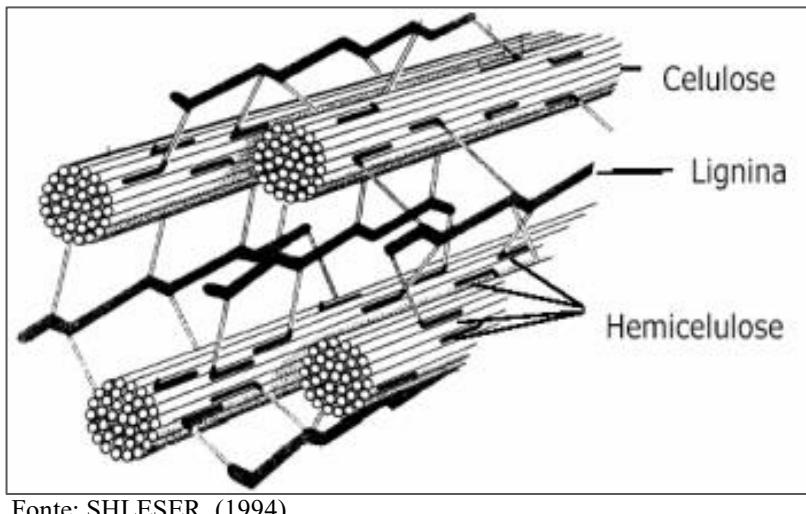
A produção de biocombustíveis a partir do material lignocelulósico envolve etapas como o pré-tratamento e a hidrólise, que visam a liberação de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa. Esses açúcares podem, posteriormente, ser utilizados em processos biotecnológicos, como a digestão anaeróbia, para a produção de biogás. (VOHRA *et al.*, 2014). Devido a sua relevância para a eficiência do rendimento do produto obtido ao final das etapas, este estudo concentra-se na etapa inicial do processo, a obtenção dos açúcares fermentescíveis por meio do pré-tratamento da biomassa. Com objetivo de avaliar qual tempo do pré-tratamento ultrassom maximizam a liberação de açúcares que podem ser fermentados por organismos para produção de biogás.

1.2. Material lignocelulósico

O material lignocelulósico são as fontes renováveis mais abundantes da natureza são resíduos orgânicos de biomassas gerados nas atividades agrícolas e industriais (CASTRO *et al.*, 2010; MITSUHARA *et al.*, 2023). Constituindo principalmente a parede celular das plantas. Esse material é composto por três principais frações: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). Eles são ligados através de forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (OURIQUE, 2016). O percentual de composição do material difere de acordo com

diversos fatores, como, espécie, idade do cultivo, período do ano da colheita, dentre outros (FORTUNATI, 2016).

Figura 1 – Compostos constituintes dos materiais lignocelulósico.



Fonte: SHLESER, (1994)

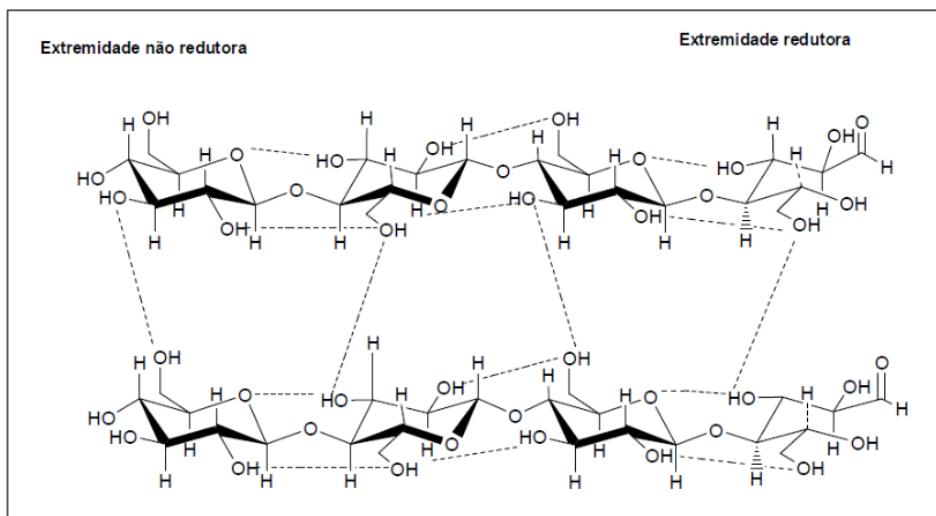
1.2.1 Celulose

Segundo Silva *et al.*, (2009) “A celulose é o material orgânico mais abundante da terra”, sendo o principal componente da parede celular das células vegetais. A celulose é um polímero linear formado por monômeros de D-glicose, interligados através de uma ligação glicosídica β -1,4. É um polímero de cadeia longa, com grau de polimerização (DP), ou seja, unidades de glicose por cadeia, variando entre 2000 e 20.000 unidades, estabilizados por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals.

Em relação à conformação linear da cadeia de celulose, as fortes interações intramoleculares e intermoleculares devido às ligações de hidrogênio conferem rigidez, estabilização, alinhamento e organização as cadeias de celulose (MITSUHARA *et al.*, 2023). Com essas características e o grau de polimerização as fibras são formadas pelas longas cadeias poliméricas unidas por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals. Com isso, a celulose se apresenta insolúvel na maioria dos solventes, além de bastante resistente à hidrólise enzimática (GALBE; ZACCHI, 2012; SHIRKAVAND *et al.*, 2016).

A cadeia de celulose pode ser convertida em açúcar fermentescível (glicose) pela atuação de celulase, um complexo celulolítico formado por endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase (RUNGRATTANAKASIN *et al.*, 2018).

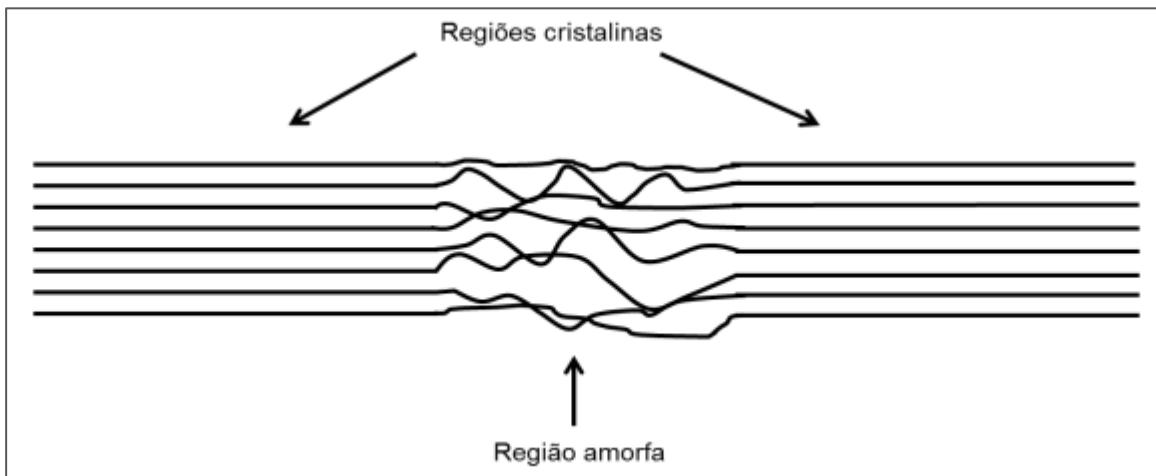
Figura 2 – Estrutura e ligações intramoleculares e intermoleculares da molécula de celulose.



Fonte: MARTINI (2009).

As cadeias de celulose apresentam duas regiões – uma cristalina, resistente à hidrólise e outra amorfã, menos resistente – A primeira, com alto grau de cristalinidade, presente em cerca de 85% da estrutura, são regiões de elevada ordem de conformação, devido a ligações de hidrogênio, apresentam maior resistência mecânica à tração e à solvatação, resultando na insolubilidade em água. A segunda, com regiões amorfãs, representa os outros 15% da estrutura, apresentam regiões desalinhadas, com partes das cadeias não alinhadas pelas ligações de hidrogênio, resultando em uma resistência inferior a qual anterior (CYPRIANO *et al.*, 2017; GONÇALVES, 2009; MITSUHARA *et al.*, 2023).

Figura 3 – Regiões amorfã e cristalinas das fibras celulósicas.

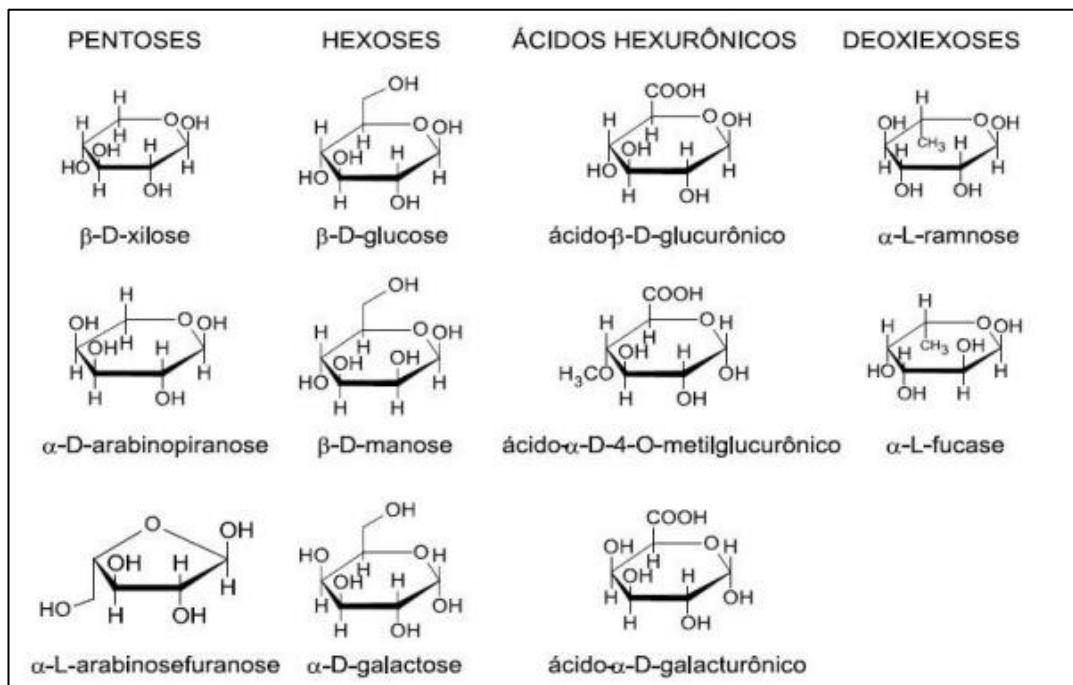


Fonte: MARTINS (2020).

1.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose apresenta composição heterogênea e estrutura amorfa, consiste em cadeias curtas e altamente ramificadas, composto por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e glucose) e ácidos urônicos (SHIRKAVAND *et al.*, 2016), ligados por ligações glicosídicas β -1,4 e β -1,3. O grau de polimerização (DP) da hemicelulose é inferior ao da celulose, com um DP aproximado entre 100-150 (TIMELL, 1967). Ademais, a hemicelulose é mais hidrofílica e mais fácil de hidrolisar que a celulose (GALBE; ZACCHI, 2012). A fração hemicelulósica atua como um elemento de ligação entre a celulose e a lignina. Sua estrutura menos rígida e solúvel permite maior flexibilidade, tornando-os menos quebradiços (SILVA *et al.*, 2009).

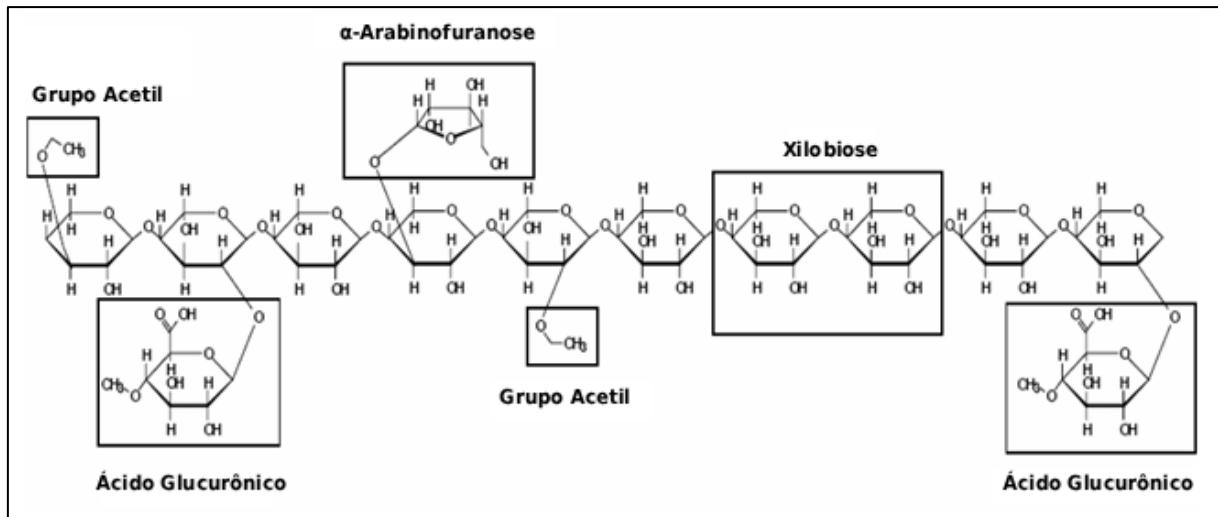
Figura 4 – Principais açúcares e ácidos que formam a hemicelulose.



Fonte: RODRIGUES; CAMARGO (2008).

A xilana é o principal componente da hemicelulose, tornando-o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (COLLINS *et al.*, 2005). Sua estrutura é composta por uma cadeia linear principal de xilopiranose (forma cíclica da xilose) unidas por ligações glicosídicas β -1,4. Os grupos laterais incluem diversos compostos (grupos acetil, ácido glucurônico, arabinose, ácido ferúlico e outros) como demonstrado na Figura 5. Devido a sua estrutura complexa torna-se necessário a utilização de uma variedade de enzimas para sua degradação e liberação de D-xilosas (FERREIRA, 2010).

Figura 5 – Estrutura típica da hemicelulose.



Fonte: MUSSATO (2002).

Alguns microrganismos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção industrial, embora fermente eficientemente hexoses, essa levedura é incapaz de fermentar com eficiência pentoses como a xilose (MOURO, 2012).

1.2.3 Lignina

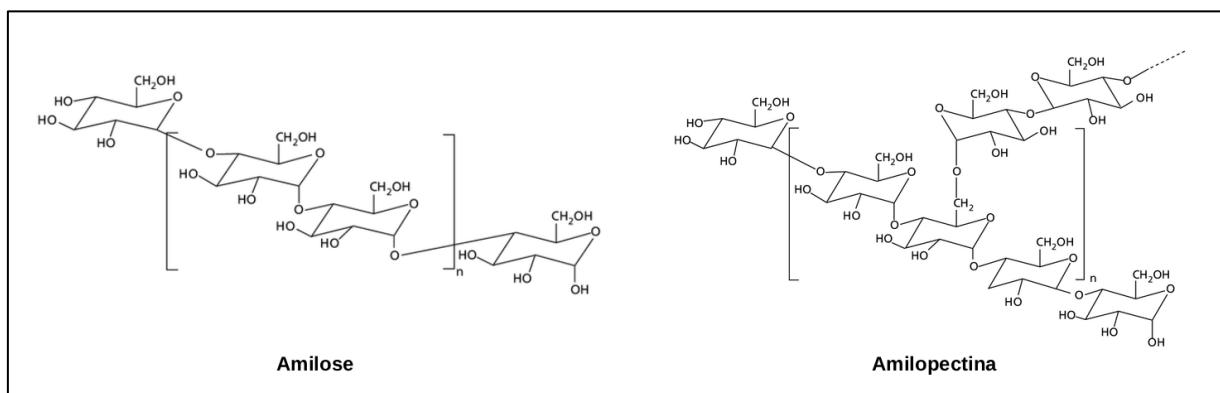
A lignina é um polímero amorfó, aromático e não solúvel em água constituído por unidades de fenilpropano (LUNDQVIST, 2002). Está intimamente ligado à celulose e à hemicelulose de forma covalente, conferindo rigidez e impermeabilidade à parede celular das plantas (OURIQUE, 2016; MITSUHARA *et al.*, 2023). Está presente em maior quantidade em partes mais rígidas como cascas e caules, e está associada a celulose agindo como um reforço estrutural, aumentando a resistência e proteção das plantas, através da impermeabilização e defesa contra microrganismos (ZHAO *et al.*, 2012). Os tecidos lignificados dificultam a atuação de enzimas sobre a parede celular vegetal, conferindo resistência ao ataque de microrganismos. Como consequência, essa estrutura atua como uma barreira natural à hidrólise da biomassa. (CYPRIANO *et al.*, 2017; PETRI, 2010; MITSUHARA *et al.*, 2023). Sua presença representa um desafio na conversão da celulose e hemicelulose em açúcares.

1.2.4 Amido

O amido é um polissacarídeo presente nas células vegetais como resultado do processo de fotossíntese, atuando como um carboidrato de reserva, em que a energia da luz solar é convertida em energia química (MAAREL *et al.*, 2002). Abundante em grãos de cereais (40 a 90% do peso seco), tubérculos (65 a 85% do peso seco), frutas (40 a 70% do peso seco) e leguminosas (30 a 50% do peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006).

Formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose e amilopectina (Figura 6). A amilose possui cadeia longas de unidades de D-glicose não ramificadas unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Consistindo em até 6.000 unidades de glicose. A amilopectina possui cadeias lineares de unidades sucessivas de glicose ligadas por ligação glicosídica α -1,4 e por cadeias laterais ligadas por ligações glicosídicas α -1,6. Consistindo em até 2.000.000 de unidades de glicose (COCA, 2019).

Figura 6 – Estrutura química da Amilose e Amilopectina presentes no amido.



Fonte: Adaptado de TESTER; KARKALAS; QI, 2004.

1.2.5 Proteínas

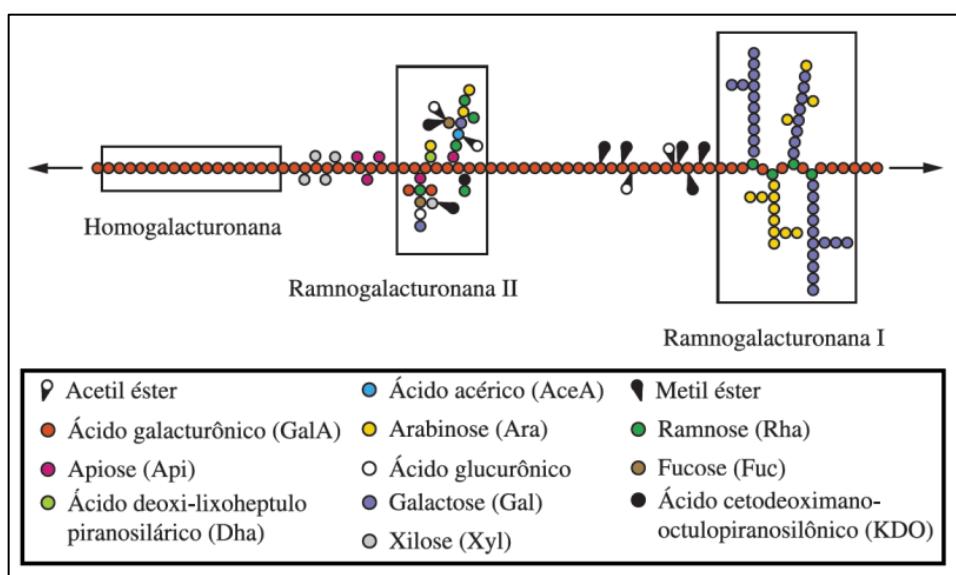
Presentes na parede celular vegetal, desempenham um papel importante na estrutura da parede por meio de ligações cruzados com outros componentes (MCDOUGALL *et al.*, 1996). Entre as proteínas presentes nas células vegetais, a melhor descrita é a extensina, uma glicoproteína constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos (lisina, serina e tirosina), essa proteína representa aproximadamente 5% da parede celular dos vegetais dicotiledôneos, e 0,5% dos cereais.

1.2.6 Pectinas

São polissacarídeos complexos formados por ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -1,4, além de açúcares como ramnose, arabinose e galactose. Está presente na lamela média das células vegetais, atuando como um suporte estrutural à parede celular, regulação da permeabilidade e participação na adesão celular entre as células vegetais. Além de estar envolvido em processos de amadurecimento dos frutos, com enzimas, como pectinases, degradando a pectina e levando à separação celular e amolecimento do fruto.

É formada por duas frações interligadas, a rammogalacturonana e a homogalacturonana, ilustrado na Figura 7 (MCDOUGALL *et al.*, 1996; THAKUR *et al.*, 1997). A fração de homogalacturonana corresponde a cerca de 60-65% do total da pectina (CANTERI *et al.*, 2012). Formada por unidades de ácido galacturônico e/ou o seu metil éster unidos por ligações glicosídicas α -1,4. Apresenta importância para aplicações tecnológicas devido as suas características de alta viscosidade e possibilidade de formar gel. A fração de rammogalacturonana pode ser dividida em dois tipos, a rammogalacturonana I (RG-I) e rammogalacturonana II (RG-II). A primeira, RG-I representa 20-35% da pectina, formada por repetidas unidades de ácido galacturônico ligado à ramnose e cadeias laterais de arabinose e galactose (CANTERI *et al.*, 2012). A segunda, RG-II é estruturalmente mais complexa e representa 10% da pectina, consistindo em unidades de ácido galacturônico contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares (CANTERI *et al.*, 2012).

Figura 7 - Representação esquemática da estrutura de pectinas.



Fonte: Adaptado de Willats *et al.*, (2006).

1.3 Pré-Tratamentos

A produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósico enfrenta diversos desafios. Dentre eles, destaca-se a complexidade estrutural das cadeias de celulose e hemicelulose, que não são diretamente aproveitadas por microrganismos em processos de digestão anaeróbia, exigindo, portanto, etapas de pré-tratamento capazes de romper essas estruturas. Outro obstáculo relevante é a estreita associação entre celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas, o que dificulta o acesso de enzimas ou reagentes químicos às frações polissacarídicas (MOSIER *et al.*, 2005). Dessa forma, o pré-tratamento torna-se uma etapa essencial para desestruturar a matriz lignocelulósica e permitir a ação enzimática sobre as frações celulósica e hemicelulósica (RADEVA *et al.*, 2012), o que não é necessário em materiais à base de amido, cuja estrutura é mais acessível à hidrólise.

Diferentes métodos de pré-tratamento podem ser aplicados para romper a estrutura da biomassa lignocelulósico. Atualmente, o pré-tratamento é considerado um dos principais gargalos biotecnológicos na produção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais (OURIQUE, 2016). Essa etapa tem o potencial de degradar parcialmente a lignina e a hemicelulose, promovendo maior porosidade, aumento da área superficial acessível e redução da cristalinidade da celulose, o que facilita a atuação das enzimas (KUMAR, 2009).

Durante os últimos anos, muitos métodos de pré-tratamentos foram desenvolvidos para o pré-tratamento eficiente de biomassa (BEHARA *et al.*, 2014). Hoje a combinação de técnicas de pré-tratamentos é uma prática frequente. A escolha do método mais apropriado depende de vários fatores, entre eles, as características da biomassa, a eficiência na liberação de açúcares, o impacto ambiental, a geração de inibidores, a viabilidade econômica do processo e entre outros. Na tabela 1, podemos citar as vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento em resíduos.

Tabela 1 – Principais técnicas de pré-tratamento em resíduos lignocelulósicos para produção de biogás.

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Mecânico (Físico)	Redução da celulose cristalina e tamanho da partícula, aumento da área superficial.	Alto gasto energético.
Irradiação (Físico)	Interrupção das ligações de hidrogênio e celulose cristalina, aumento da área superficial	Alto gasto energético, problema de escala.
Ácido (Químico)	Hidrólise da hemicelulose, alteração da estrutura da celulose.	Alto custo com ácidos, formação de inibidores.
Alcalino (Químico)	Hidrólise da lignina, alteração da estrutura da celulose.	Alto custo com alcalinizante, formação de inibidores.
Oxidativo (Químico)	Remoção da hemicelulose e lignina.	Custo elevado, formação de inibidores.
Solvente orgânico (Químico)	Solubilização da lignina/hemicelulose ou celulose.	Alto custo com solventes, remoção do solvente.
Explosão à vapor (Físico-Químico)	Hidrólise da hemicelulose e lignina, destruição da estrutura da celulose cristalina.	Alto consumo energético, formação de recalcitrantes.
Extrusão (Físico-Químico)	Destruição da estrutura da celulose, aumento da área superficial.	Alto consumo energético.
Microbiológico (Biológico)	Hidrólise da lignina e hemicelulose, alteração da estrutura da celulose, baixo consumo energético.	Processo lento, perda de carbono, necessário grande área isolada.
Enzimático (Biológico)	Alteração da estrutura celulósica, deslignificação, hidrólise parcial da hemicelulose, baixo consumo energético.	Alto custo das enzimas, requerimento de adição contínua.

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2020.

1.3.1 Métodos químicos

Diversos métodos de pré-tratamento químico foram investigados nas últimas décadas. O pré-tratamento químico se provou promissor. No entanto, uma grande quantidade de produtos químicos e água é necessária na maioria dos tratamentos, necessitando de reciclagem de produtos, descarte de resíduos de solução, as vezes altas temperaturas, alto custo e potencial poluição ambiental (BRODEUR, 2011). Alguns dos métodos químicos mais promissores e estudados incluem o pré-tratamento ácido e alcalino.

Pré-tratamento ácido

É o método químico mais comumente utilizado, em sua maioria em meio de ácido sulfúrico, além de outros ácidos como, fosfórico, nítrico e o carboxílico. Sua atuação, sem distinção de grupos ou cadeias específicas, ocasiona na produção de diversos produtos de degradação do açúcar e compostos aromáticos. Dessa forma, gera também na formação de diversos subprodutos prejudiciais para o desempenho da fermentação, ocasionando na principal desvantagem desse método (BEHARA *et al.*, 2014; GALBE; ZACCHI, 2012).

Alguns subprodutos que podem ser gerados com a utilização desse pré-tratamento incluem, o furfural (2-furaldeído) originados a partir das pentoses e ácidos urônicos derivados da hemicelulose quando desidratadas. Além do subproduto Hidroximetilfurfural (HMF) gerados a partir das hexoses, quando sofrem a mesma reação. Ademais, dependendo das condições que o material é submetido podem gerar ácido acético a partir da hidrólise de grupos acetílicos, compostos fenólicos e não fenólicos aromáticos (JONSSON; MARTÍN, 2016).

Outras desvantagens relacionadas a este método incluem o elevado custo dos materiais necessários para construção de reatores, que devem suportar agentes corrosivos e formação de sulfato de cálcio durante a reação. A reação pode ser conduzida de duas maneiras, a primeira com altas concentrações de ácidos e baixas temperaturas, mais economicamente viável, e a segunda em baixas concentrações de ácido e altas temperaturas, possibilitando maior aplicabilidade, devido a geração inferior de inibidores da fermentação (JONSSON; MARTÍN, 2016).

Pré-tratamento alcalino

Do ponto de vista operacional o método alcalino é mais atraente, em comparação com o método ácido, pois emprega condições de pressão e temperatura inferiores do que o pré-tratamento ácido. Seu método de ação envolve reações de liberação e saponificação, provocando inchaço das estruturas fibrosas onde a água ocupa os espaços formados, quebrando as ligações de hidrogênio entre a lignina e a porção de celulose e hemicelulose. Os principais compostos utilizados nesse método são o hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e etileno diamina (NASCIMENTO, 2011).

Apesar desse método gerar menos inibidores da fermentação, sua utilização ainda pode gerar alguns compostos tóxicos como, os ácidos carboxílicos, ácidos fórmico, acético e láctico. As principais desvantagens relacionadas a esse método é a longa duração e a necessidade de neutralização da suspensão de pré-tratados (HAGHIGHI *et al.*, 2013).

1.3.2 Métodos biológicos

Os métodos biológicos é uma alternativa menos prejudicial ao meio ambiente, pois sua utilização não requer o uso de muitos reagentes químicos, pequeno consumo energético e as condições de reação são moderadas. Entretanto, as técnicas enfrentam problemas que dificultam sua aplicação comercial em larga escala. Esses inconvenientes incluem o tempo de reação longo, a necessidade de um amplo espaço de instalação e a necessidade de contínuo monitoramento do crescimento de microrganismos durante a operação (HAGHIGHI *et al.*, 2013). O objetivo desses tipos de métodos é a deslignificação, remoção da fração de lignina do resíduo. Pois expor as frações de celulose e hemicelulose torna a hidrólise mais eficiente (SHRESTHAN *et al.*, 2017). O processo também pode melhorar a qualidade do substrato, eliminando compostos que afetam a eficiência da posterior digestão anaeróbia. Os principais métodos utilizados são o uso de microrganismo ou enzimas, objetivando a deslignificação (ZHENG *et al.*, 2014).

Pré-tratamento utilizando microrganismos

Diversas espécies de bactérias e fungos são capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose de materiais lignocelulósico, por meio de enzimas produzidas naturalmente pelos seus organismos. Entretanto, os açúcares resultantes desse processo são, muitas vezes,

intermediários de seus metabolismos, podendo ocorrer o consumo durante a reação e consequentemente, diminuindo a eficiência do pré-tratamento (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Pré-tratamento utilizando enzimas

A sacarificação por meio da hidrólise enzimática a partir de enzimas previamente extraídas e isoladas é considerada por diversos autores como essencial para a conversão eficiente de celulose e hemicelulose em polímeros consumíveis por microrganismos durante a etapa de fermentação, podendo inclusive ser utilizada em conjunto com outros métodos de pré-tratamento. Celulases devem ser utilizadas para hidrolisar a fração celulósica. Enquanto as xilases empregadas para hidrolisar a fração hemicelulósica. (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). Contudo, a utilização de enzimas pode elevar o custo do processo.

1.3.3 Métodos físico-químico

Nessa categoria são utilizados agentes químicos junto com processos físicos. Os dois objetivos são aumentar a área superficial do material sólido e hidrolisar parcialmente a biomassa. Os principais métodos incluídos nessas categorias são descritos a seguir.

Explosão a vapor

Nesse método, a biomassa a ser tratada é submetida a alta pressão (15 a 48 bar) e temperaturas elevadas (200 a 250 °C) com períodos que variam entre 0,5 a 5 minutos. Logo após, o material é exposto à pressão atmosférica, reduzindo a pressão abruptamente. Essa descompressão súbita é responsável pela quebra do complexo lignina e carboidratos (PIELHOP *et al.*, 2016). Atualmente esse método é o mais comumente utilizado para o desenvolvimento de biorrefinarias comerciais (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Algumas desvantagens conhecidas são, a quebra incompleta da matriz de lignocarboidrato, a geração de compostos inibitórios devido às condições severas do processo. (SUN; CHENH, 2002; AGBOR *et al.*, 2011).

Explosão de fibra com amônia

Tem etapas similares ao método anterior, com a biomassa colocada em contato com a amônia a uma alta pressão (17,2 a 20,6 bar) e uma temperatura moderada (60 a 120 °C) durante um período de geralmente 30 minutos. Logo seguido por um processo rápido de descompressão. O processo cliva as ligações entre a lignina e o complexo tornando as frações de celulose e hemicelulose mais acessíveis a enzimas na posterior etapa de hidrólise (MOOD, *et al.*, 2013). As vantagens desse método incluem, o baixo consumo de energia em comparação a explosão a vapor devido a temperatura moderada, a mínima geração de inibidores (BALAT *et al.*, 2008). Entre as desvantagens estão a toxicidade da amônia e, consequentemente, a necessidade de sua recuperação devido ao descarte por questões ambientais e sanitárias (SILVA, 2013).

Explosão de CO₂

Nesse método é utilizado o gás dióxido de carbono em seu estado supercrítico, devido à baixa viscosidade e alta pressão do processo ele penetra nos poros da biomassa. Após ser dissolvido em água, o CO₂ formará ácido carbônico, que auxilia na hidrólise da hemicelulose (KIM; HONG, 2011). As vantagens desse método incluem, o baixo custo do dióxido de carbono, a não geração de compostos indesejáveis e o não uso de temperaturas elevadas. Entretanto, o alto custo dos equipamentos utilizados para suportar a alta pressão são desafios que podem ser citados nesse processo em grande escala (ZHENG *et al.*, 1995).

1.3.4 Métodos físicos

Os métodos físicos utilizam energia mecânica com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas e, consequentemente, aumentando a área superficial, causando a quebra de ligações de cadeias das moléculas de carboidratos, diminuindo assim o grau de polimerização (FAN *et al.*, 2006; GUARPURAY, 1982; SOUSA *et al.*, 2009). Usualmente, utiliza-se a moagem ou Trituração nesse processo, reduzindo o tamanho das partículas de 10-30 mm para 0,2-2 mm (KUMAR *et al.*, 2009). Esses métodos são utilizados em conjunto com outros métodos ou com a etapa de hidrólise enzimática, aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose e hemicelulose por meio de mudanças estruturais na amostra, sem alterar sua composição química. Os principais exemplos de pré-tratamentos nessa categoria são: moagem

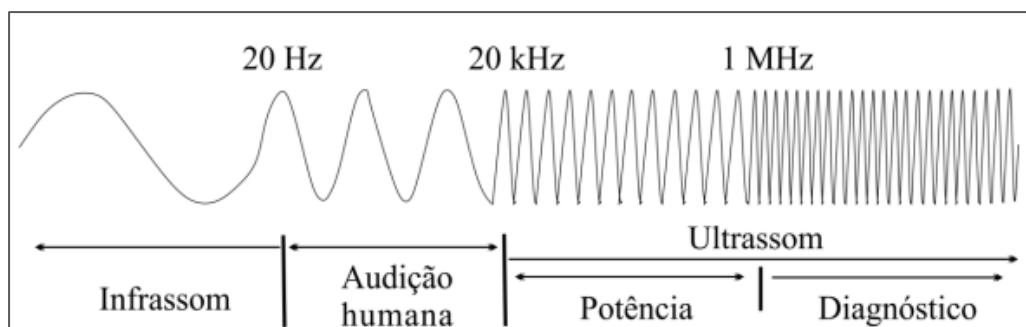
de discos, moagem de bolas, extrusão, irradiação de micro-ondas, irradiação de ultrassom (KUMARI; SINGH, 2018; PONNUSAMY *et al.*, 2019). A principal desvantagem relaciona a esse tipo de pré-tratamento é a alta demanda energética, dificultando assim sua utilização em larga escala (HENDRINKS; ZEEMAN, 2009).

1.3.5 Ultrassom

O ultrassom utiliza ondas sonoras para desorganizar e desestruturar o material, facilitando etapas posteriores como a hidrólise enzimática, tornando os carboidratos estruturais mais acessíveis as enzimas. Esse método se destaca devido à possibilidade de combinar com outros métodos, seu caráter sustentável, sem produção de poluentes e resíduos indesejáveis. (BUSSEMAKER; ZHANG, 2013).

A frequência da onda sonora determina o seu tipo. A faixa abaixo dos 20 Hz corresponde ao infrassom, são ondas sonoras de frequência baixas imperceptíveis pelo ouvido humano. Utilizado por equipamentos de barcos e submarinos chamados de SONAR (*sound navigation and ranging*). As ondas sonoras com uma frequência entre 20 Hz e 20 kHz são perceptíveis ao ouvido humano (Figura 8). A frequência acima de 20 kHz é considerada ultrassom, dividido em duas utilizações. A primeira faixa que compreende de 20 kHz a 1 MHz ultrassom de potência, banda essa utilizada em estudos de pré-tratamento. A segunda faixa acima de 1 MHz utilizada para diagnósticos clínicos. A tecnologia do ultrassom de potência em materiais lignocelulósico é baseada na desestruturação do material através da aplicação de ondas acústicas de alta intensidade (VILKHU *et al.*, 2011).

Figura 8 – Espectro sonoro.



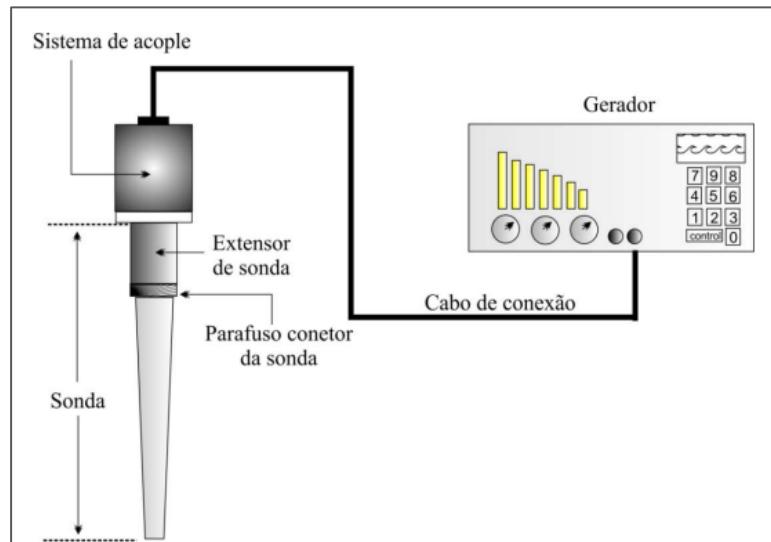
Fonte: KENTISH; ASHOKKUMAR (2011).

Ultrassom de ponteira

O ultrassom de ponteira é uma técnica utilizada como pré-tratamento físico para promover a desestruturação de materiais lignocelulósicos, facilitando o acesso das enzimas aos componentes da biomassa. Utiliza-se uma sonda para transmitir as ondas sônicas de ultrassom ao meio, produzida por um transdutor, através de uma sonda metálica, como ilustrado na figura 9. O gerador produz o sinal elétrico na frequência e potência específica desejada, a intensidade da onda e amplitude da vibração pode ser controlada alterando a potência do gerador. Já a transformação da energia elétrica em acústica é realizada por um transdutor piezelétrico. Por fim, a sonda é imersa diretamente na amostra líquida ou semilíquida e transmite a energia acústica ao meio tratado (PINJARI; PANDIT, 2010).

As sondas devem ser fabricadas com um material que ofereça boa resistência à fadiga dinâmica, baixas perdas acústicas e resistência à erosão produzida na cavitação. Ligas de titânio são os materiais mais utilizados para este fim (YU; GIURGIUTIU, 2009).

Figura 9 – Sistema do tipo sonda para aplicação de ultrassom de potência.

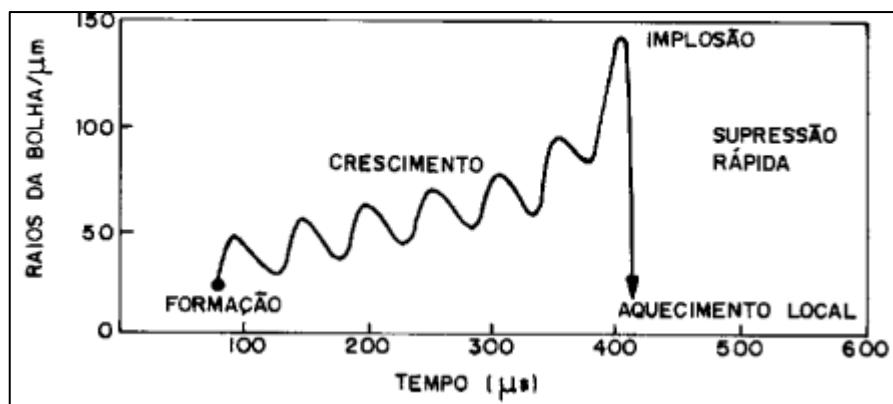


Fonte: YU GIURGIUTIU (2009).

O mecanismo responsável pela ação do ultrassom é a cavitação acústica, fenômeno que ocorre a formação, crescimento e colapso violento de microbolhas no meio tratado (SUSLICK, 1989). A origem da cavitação se deve ao fato que, quando a sonda ultrassônica vibra em alta frequência (20 kHz ou mais) gera ondas sonoras que se propagam no meio, gerando ciclos alternados de compressão (alta pressão) e expansão (baixa pressão). Durante o ciclo de expansão, a pressão do líquido diminui permitindo a formação de microbolhas. Estas

microbolhas crescem progressivamente a cada ciclo, incorporando vapor e gases dissolvidos ao seu interior ou por coalescência com outras bolhas adjacentes, até que a microbolha atinja um tamanho crítico, ocorrendo o colapso abrupto, estas etapas estão representadas na Figura 10. Com esse colapso, a temperatura no interior das microbolhas pode chegar a cerca de 5.500° C, enquanto ao redor pode chegar a 2.100° C. A pressão é estimada em torno de 500 atm. Esse mecanismo de ação provoca a ruptura e desagregação da matriz lignocelulósica da biomassa.

Figura 10 – Ilustração da formação, crescimento e colapso das microbolhas durante o ultrassom.



Fonte: MARTINES; DAVOLOS; JAFELICCI JÚNIOR (2000).

1.4. Hidrólise enzimática

A produção de biocombustíveis de segunda geração necessita de uma etapa de hidrólise dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) para disponibilização dos carboidratos para posterior digestão anaeróbia. A etapa de hidrólise pode ocorrer de duas formas, através do emprego dos métodos de hidrólise ácida ou enzimática. Ambas possuem o mesmo objetivo, a liberação de açúcares fermentescíveis, porém se diferem no catalisador utilizado.

A hidrólise ácida utiliza ácidos concentrados (superior a 5%) ou diluídos (inferior a 5%). A desvantagem deste catalizador se refere a sua ação não específica na cadeia celulósica e hemicelulósica, sendo essencial o controle da reação para evitar reações paralelas indesejáveis que levaria a uma redução da eficiência do processo.

A hidrólise enzimática utiliza enzimas que atuam de forma específica em diferentes sítios da cadeia celulósica e hemicelulósica, sendo catalisadores de elevada especificidade, minimizando a ocorrência de reações secundárias, promovendo uma maior eficiência ao

processo. No entanto, o tempo lento de reação e uma alta sensibilidade à ação de inibidores de reação são pontos indesejáveis desse processo (LUCARINI *et al.*, 2017). Levando em consideração sua maior eficiência e o impacto ambiental reduzido da hidrólise enzimática em comparação à ácida, este estudo utilizou o processo enzimático para a disponibilização dos açúcares fermentescíveis e a atuação das enzimas nesse processo está descritas a seguir.

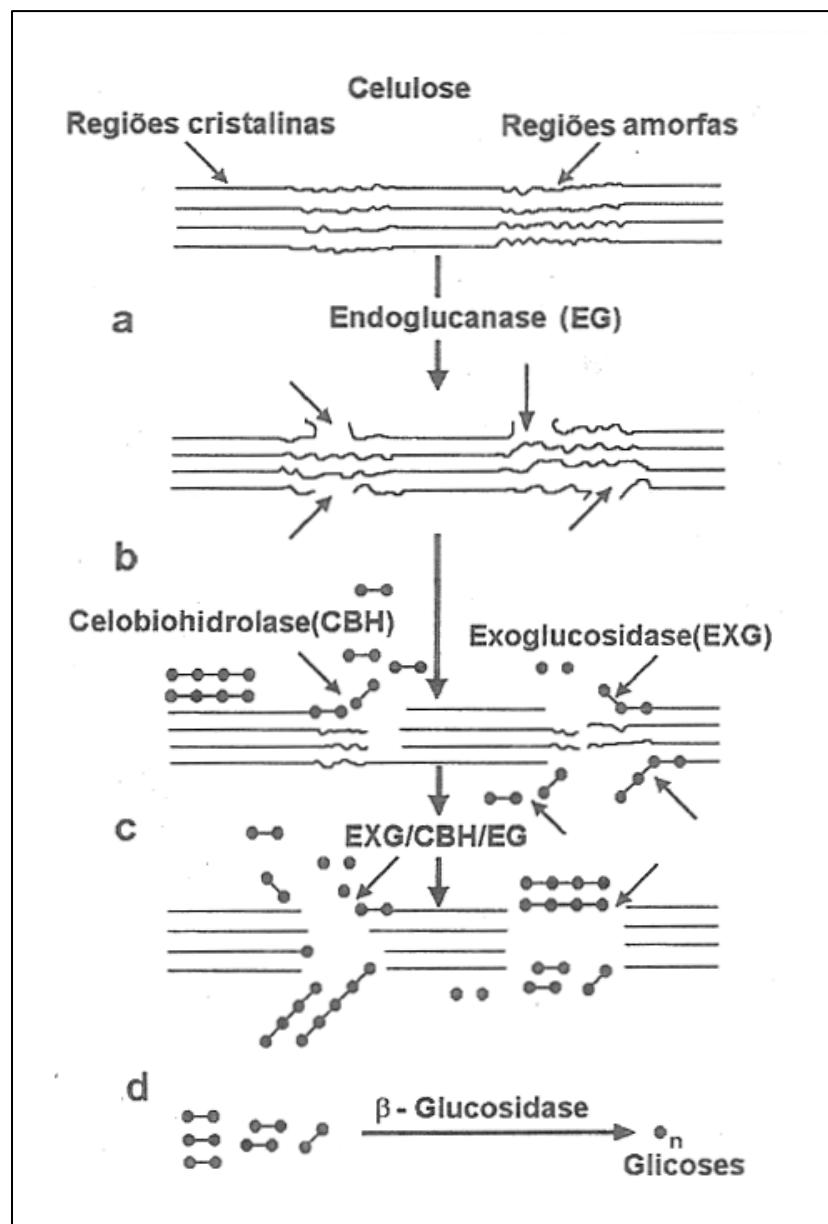
1.5 Tipos de enzimas

Enzimas são proteínas que tem a função de catalisar reações por promoverem um mecanismo alternativo, no qual a barreira da energia de ativação é menor do que a reação sem sua presença (ALBERTS *et al.*, 1989). Esses catalisadores são capazes de aumentar a velocidade de uma reação química em milhares de vezes, quando comparada a uma reação espontânea (COCA, 2022). Além disso, não necessitam de temperaturas elevadas e são específicas (SILVA; FRANCO; GOMES, 1997). Diversos fatores podem inibir a atividade das enzimas, entre eles, variações de pH, variações de temperatura, bloqueio do sítio ativo por um composto semelhante ao substrato ou deformação da enzima por inibidores que inativam coenzimas, cofatores ou produtos das reações (NELSON; COX, 2011). Os principais tipos de enzimas estão descritas abaixo.

1.5.1 Celulases

São hidrolases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas β -1,4 entre resíduos de D-glicose na molécula de celulose e seus derivados solúveis. A classificação das celulases varia de acordo com local de atuação no substrato (HENRISSAT, 1991). Para a degradação da celulose é necessário a ação de um complexo celulolítico envolvendo quatro enzimas (Figura 11), divididas em três grupos: endoglucanases (EnG) atuam clivando ligações internas nas cadeias celulósicas; exoglucanases (ExG) atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG) hidrolisam oligossacarídeos em glicose (LYND *et al.*, 2002). Quando esse complexo celulolítico atua conjuntamente apresenta um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, tal efeito é conhecido como sinergia.

Figura 11 - Representação esquemática da ação sinergística das celulases



Fonte: (adaptado de Bisaria & Ghose (IO) e Elisashvili (LIMA *et al.*, 2005).

Endoglucanase (EnG)

A enzima 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolise (EC 3.2.1.4) é responsável por iniciar a hidrólise, reduzindo o grau de polimerização. Atua aleatoriamente nas regiões internas da estrutura amorfã da cadeia celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e novos terminais não redutores e terminais redutores livres para atuação da exoglucanase (LYND *et al.*, 2002).

Exoglucanases (ExG)

Catalisam a segunda ligação glicosídica a partir da extremidade não redutora da molécula, liberando celobiose e glicose (WOOD; KELLOGG, 1986). Esse grupo é constituído pelas enzimas glucano-hidrolase (GH) e celobio-hidrolase (CBH) são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND *et al.*, 2002). A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese – ruptura física do substrato, acarretando a desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais e tornando regiões cristalinas em regiões amorfas – promovendo aumento na taxa de hidrólise da celulose (ZHANG; LYND, 2004). Sua atuação ocorre tanto em terminais redutores (CBH I) e terminais não redutores (CBH II) (AWAFO, 1997).

β -glucosidase (BG)

Por fim, a enzima celobiase ou β -glicosidase (EC 3.2.1.21). A BG tem a propriedade de hidrolisar oligossacarídeos (GP<7) e celobiose em glicose (LYND; ZHANG, 2002). Sua presença reduz a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela diminuição da concentração da celobiose, composto este inibidor desses tipos de enzimas (PETROVA *et al.*, 2002), aumentando também a concentração de glicose no meio (WILSON, 2008).

1.5.2 Hemicelulases

Se refere a um grupo amplo de enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose. Uma vez que essa molécula é formada por diferentes açúcares e outros compostos, a sua degradação necessita de enzimas específicas.

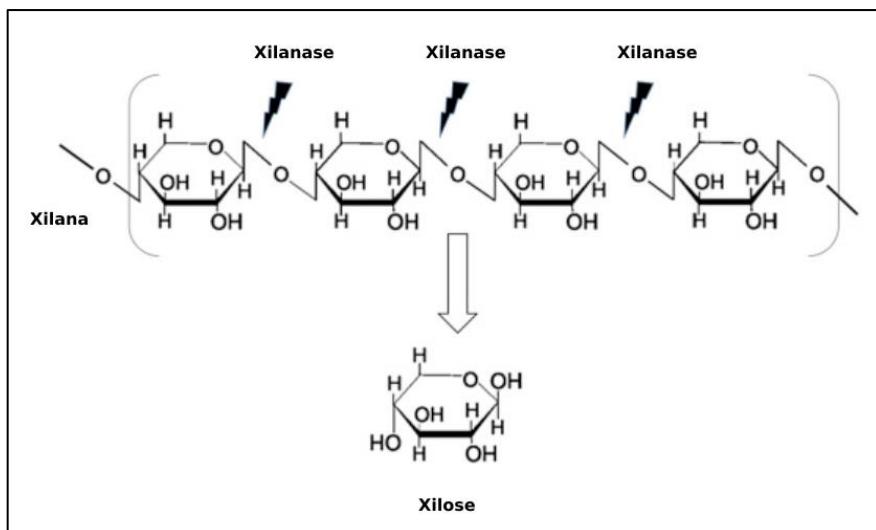
Xilanase

São glicosidases responsáveis pela hidrólise aleatórias das ligações β -1,4 das xilanas, principal polímero da hemicelulose formado por unidades de D-xilose. Essa hidrólise provoca a liberação de xilo-oligossacarídeos, que será convertido em xilose pelas β -xilosidases (WOOD; KELLOGG, 1986).

β-xilosidase

Completam a degradação da cadeia longa de xilana. Catalisando a hidrólise de xilo-oligossacarídeos liberando D-xilose a partir da extremidade não redutora (WOOD; KELLOGG, 1986). Tendo em vista que a hemicelulose é constituída de vários polímeros, formados por diferentes açúcares, a sua degradação completa necessita da ação de várias enzimas específicas, a atuação de algumas delas está descrita a seguir.

Figura 12 – Estrutura da xilana com destaque na atuação da xilanase para liberação de xilose.



Fonte: Adaptado de GODOY *et al.*, 2018.

Arabinofuranosidase

Catalisa a liberação de arabinose de polissacarídeos, rompendo as ligações entre arabinofuranose e outras unidades de açúcar em cadeias maiores. Atuando na ligação glicosídica do terminal não redutor nas arabinanas e outros polissacarídeos (WOOD; KELLOGG, 1986).

α-Galactosidase

Catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas entre a galactose e outros açúcares. Liberando galactose de polisacarídeos e oligosacarídeos que contém esse açúcar. (WOOD; KELLOGG, 1986).

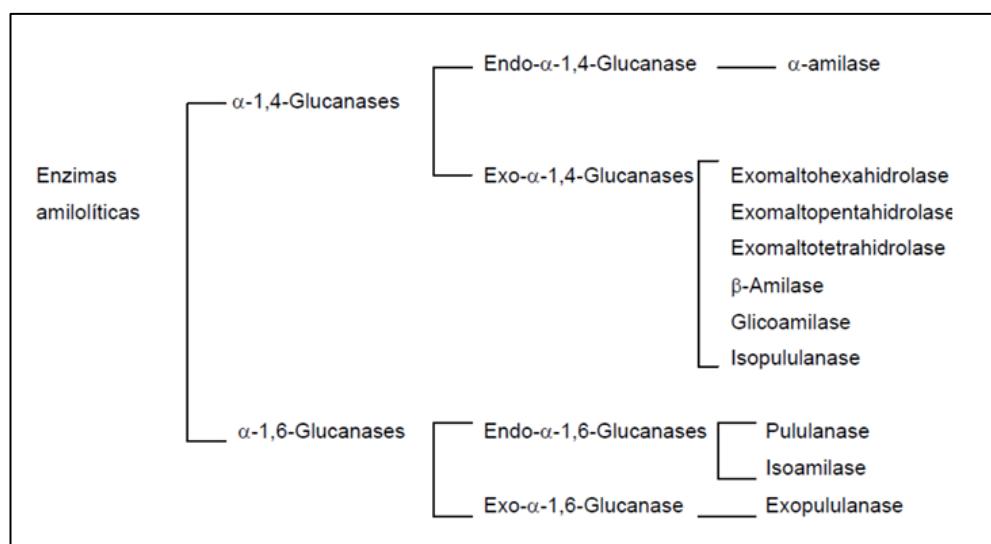
Manase

Catalisa a liberação de manoses a partir do terminal não redutor das mananas e outros polissacarídeos formados de manoses (WOOD; KELLOGG, 1986).

1.5.3 Amilases

As enzimas aminolíticas são um grupo de enzimas que hidrolisam moléculas de amido em produtos, como dextrinas e outros polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA *et al.*, 2003). Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com a especificidade pela estrutura do substrato em: α -amilase, β -amilase, amilo-glucosidase, pululanase e isoamilase. As α -amilase quebram, de forma aleatória, ligações glicosídicas α -1,4 dos polissacarídeos com três ou mais unidades de D-glicose. São endoamilases, ou seja, atuam no interior da molécula de amido. A β -amilase são exoamilases, atuam de forma sequencial a partir da extremidade não redutora dos polissacarídeos, promovendo a hidrólise da segunda ligação glicosídica α -1,4 e liberando unidades de β -maltose (GUPTA *et al.*, 2003). A amilo-glucosidase, é uma enzima que cliva as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora (PANDEY *et al.*, 2000). As pululanase e as isoamilase são enzimas que atuam em ligações glicosídicas α -1,6 presentes em grupos ramificados de polissacarídeos como o amido. Sua atuação cliva grupos ramificados, facilitando a ação de outras enzimas.

Figura 13 – Classificação das enzimas aminolíticas.



Fonte: NIGAM; SINGH, 1995.

1.5.4 Pectinases

Se referem as enzimas que catalisam a degradação das cadeias constituídas por unidades de ácidos galacturônicos, apesar da pectina conter outros açúcares em sua composição. De acordo com seu mecanismo de ação, as enzimas pectinolíticas podem ser classificadas principalmente em três tipos: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas e, as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (SAKAI *et al.*, 1993).

1.6 Enzimas utilizadas no estudo

1.6.1 Celluclast

A Cellulast® é uma celulase comercial derivada do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, é amplamente estudada e utilizada na indústria devido à sua capacidade de degradar completamente tecidos contendo celulose, catalisando a quebra da celulose em glicose e celobiose. (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016). Consistem em um complexo celulolítico com celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases (KUBICEK, 1992). A ação sinérgica de todos os três tipos de componentes enzimáticos é necessária para a hidrólise da celulose e todo o sistema celulase atua para converter a celulose em glicose (LIU *et al.*, 2012). A enzima também atua promovendo a redução da viscosidade dos vegetais e promove um aumento do rendimento no processo de extração (NCBE, 2010).

Este complexo enzimático foi utilizado na hidrólise enzimática com objetivo da transformação da celulose em açúcares fermentescíveis (glicose), proporcionando um ambiente nutritivo adequado para a fermentação e produção de biogás.

1.6.2 Alfa-amilase

A alfa-amilase ou α -amilase são endoamilases que atuam aleatoriamente ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltoligossacarídeos (DECLERCK *et al.*, 2000).

A amilase utilizada é derivada da bactéria *Bacillus licheniformis*. Esta enzima é amplamente utilizada na liquefação de amido, indústria de papel, alimentícia, farmacêutica e

açucareira (AKHER *et al.*, 1973; NIGAM; SINGH, 1995) devido à eficiência na conversão de amidos em oligossacarídeos (PEDERSON; NIELSEN, 2000).

1.6.3 Complexo enzimático

O complexo enzimático ou mosto contém três enzimas, amilo-glucosidase (AMG), alfa-amilase e uma protease neutra. A enzima amilo-glucosidase é largamente utilizada na indústria cervejeira para a hidrólise mais eficiente do amido, com capacidade de quebrar as ligações α -1,4 e a α -1,6 das cadeias de amilopectina, levando a conversão de dextrinas em açúcares fermentescíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação do efeito do pré-tratamento ultrassom e hidrólise enzimática em resíduos agroindustriais para otimização da liberação de açúcares fermentescíveis.

2.2 Objetivos específicos

1. Submeter o resíduo de frutas e verduras (RFV) ao tratamento de ultrassom em diferentes tempos.
2. Submeter o RFV pré-tratado por ultrassom a hidrólise enzimática para as enzimas: Celluclast, Alfa-amilase e Complexo enzimático (Amilo-glucosidase, Alfa-amilase e Protease).
3. Quantificar os açúcares obtidos liberados após os pré-tratamentos aplicados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)

Foi utilizado como amostra padrão, denominada de Resíduos de Frutas e Verduras (RFV), uma composição específica (Tabela 2) definida a partir de uma pesquisa de quais frutas e hortaliças eram mais frequentemente descartadas da Central de Abastecimento de Alimentos do Ceará (CEASA-CE) (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Composição do Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)

Fruta ou verdura	Percentual (%)
Laranja	47,16
Cebola	8,63
Mamão	6,18
Milho verde	6,11
Abacate	5,35
Melancia	3,85
Melão	3,47
Abacaxi	3,46
Batata inglesa	3,40
Banana	3,33
Repolho	2,65
Goiaba	1,32
Tomate	1,13
Pimentão	1,05
Beterraba	1,04
Maça	0,74
Maracujá	0,50
Cenoura	0,42
Abóbora	0,21

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Resíduo de Frutas e Verduras (RFV)



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2 Enzimas

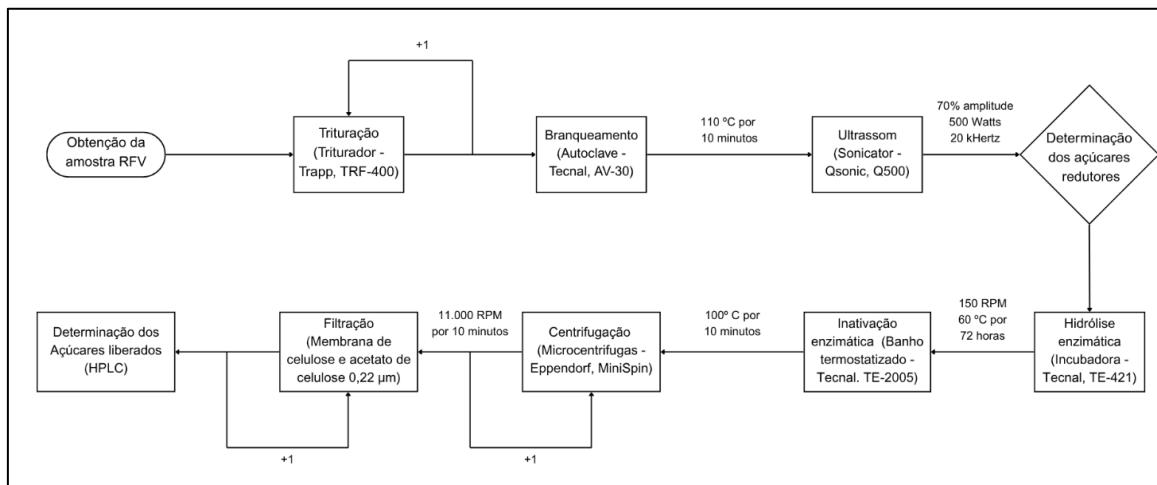
No presente estudo, utilizou-se as enzimas celulase comercial Celluclast® de *Trichoderma reesei*, 1,5 L (Novozyme, Bagsvaerd, Dinamarca), a alfa-amilase de *Bacillus licheniformis*, adquirida da Prodooze (São Paulo, Brasil) e o complexo enzimático com Amilo-glucosidase, alfa-amilase e protease neutra, adquirida da Prodooze (São Paulo, Brasil).

3.2 Descrição geral das etapas experimentais

A fim de proporcionar uma visão geral das atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho, a Figura 15 apresenta o fluxograma com a sequência das principais etapas metodológicas. O processo tem início com a obtenção da amostra de RFV, cuja composição específica está descrita na Tabela 2, seguida pela preparação da amostra, que incluiu as etapas de Trituração e branqueamento térmico, realizado com o objetivo de reduzir a carga microbiana. Em seguida, a amostra foi submetida ao pré-tratamento ultrassônico, aplicado por seis tempos distintos. Após essa etapa, foi realizada a determinação da concentração de açúcares redutores no resíduo pré-tratado. Posteriormente, o material foi submetido à hidrólise enzimática, conduzida em frascos Erlenmeyer. Ao término da reação, os frascos foram aquecidos para promover a inativação das enzimas e interromper o processo de hidrólise. Por fim, foram coletadas alíquotas, as quais foram centrifugadas para separação das fases sólida e

líquida. A fração líquida foi então filtrada e utilizada para a quantificação de açúcares e outros compostos por meio de Cromatografia Líquida.

Figura 15 – Fluxograma das etapas experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Métodos

3.3.1 Determinação da atividade das enzimas utilizadas

A determinação da atividade enzimática foi realizada por meio de protocolos previamente estabelecidos. Para a celulase (Celluclast), a atividade foi quantificada utilizando o método descrito por Ghose (1987), baseado na liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise com leitura espectrofotométrica após reação com DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A atividade da alfa-amilase e da amilo-glucosidase foi determinada conforme o protocolo proposto por Gonçalves (1996), utilizando amido como substrato e também mensurando os açúcares redutores formados por meio da reação com DNS. Foi utilizado a atividade da amilo-glucosidase como o parâmetro principal para a atividade do complexo enzimático.

3.3.2 Obtenção da amostra padrão RFV

As frutas e hortaliças que compõem a amostra RFV foram coletadas da Central de Abastecimento de Alimentos do Ceará (CEASA-CE) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a partir de materiais destinados ao descarte. A amostra

foi submetida a um processo de homogeneização, sendo triturada duas vezes em triturador modelo TRAPP TRF-400, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas.

3.3.3 Branqueamento

Para garantir a conservação dos resíduos e viabilizar as análises experimentais futuras, foi realizado o branqueamento das amostras. Para esse procedimento, aproximadamente 200 gramas do resíduo triturado foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, os frascos com o material foram submetidos à 110 °C por um período de 10 minutos, em uma autoclave vertical linha AV, modelo AV-30.

3.3.4 Pré-tratamento ultrassom

Ultrassom

Após os procedimentos realizado no resíduo, conforme descrito no item 3.3.2 e 3.3.3, realizou-se o pré-tratamento ultrassom no resíduo em diferentes condições de tempo a fim de avaliar o melhor tempo para obtenção de açúcares fermentescíveis. O processo deu-se com a utilização de um instrumento sonicador (Sonicator Qsonic Model Q500), sonda padrão 4220, potência de 500 W, frequência de 20 kHz, amplitude de 70% e tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, com intervalos intercalados de 10 segundos *on* e *off* em um bêquer refrigerado com gelo para evitar o superaquecimento. A sonda do equipamento foi imersa na amostra RFV com profundidade de 3,0 cm. Após as amostras tratadas serem deixadas para resfriar até a temperatura ambiente, foram armazenadas em freezer para evitar contaminação microbiana.

Determinação da concentração dos açúcares redutores do resíduo pré-tratado por ultrassom

Para identificar quais tempos de ultrassom eram mais apropriados para realização da hidrólise enzimática, foram quantificados, por espectrofotometria, os açúcares redutores totais liberados no ultrassom. Para a quantificação dos açúcares redutores, foi seguido o protocolo descrito por Maldonade, Carvalho e Ferreira (2013), da Embrapa Hortaliças. As amostras foram submetidas à reação com o reagente DNS e, em seguida, aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 540

nm. Os cálculos foram realizados com auxílio da curva-padrão de DNS para obter os valores em mg/L de açúcares redutores. A análise estatística foi feita utilizando o software Microcal Origin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA) por meio de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

3.3.5 Hidrólise enzimática

Hidrólise enzimática com o resíduo pré-tratado

A hidrólise enzimática foi conduzida conforme a metodologia MOYA *et al.*, (2023). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos com os resíduos pré-tratado por ultrassom por 10 e 20 minutos. Para cada tempo de pré-tratamento, o resíduo foi submetido a diferentes tratamentos enzimáticos: sem enzimas, somente Celluclast, somente alfa-amilase, somente complexo enzimático e uma combinação de Celluclast com alfa-amilase. Em frascos Erlenmeyers de 250 mL vedado, para evitar perda de volume por evaporação, foram adicionados a amostra de RFV (40% p/v) pré-tratado com ultrassom, 4,70 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 0,05 mL de azida sódica 5,0% (50 mg/mL H₂O). Seguida pela adição das enzimas, a quantidade adicionada de cada enzima está descrita na Tabela 3. Após adição do volume apropriado de solução enzimática, água Milli-Q foi adicionada aos frascos para obter um volume total de reação de 12,5 mL. A hidrólise enzimática ocorreu em incubadora orbital refrigerada com agitação (Tecnal – Modelo TE-421) a temperatura de 60° C ± 3°C, agitação de 150 RPM por um período de 72 horas. Ao final do processo, os frascos Erlenmeyers contendo o meio de reação foram aquecidos a 100 °C por 10 minutos, para inativação das enzimas e alíquotas de 2 mL foram coletadas para determinar a quantidade de açúcares obtido. Para isso, as amostras foram centrifugadas a 11.000 RPM por 10 minutos em Centrifuga Spin microtubo para separação da fração líquida, filtrada em membrana (celulose e acetato de celulose) de 0,22 µm e posteriormente armazenadas para análise de açúcares e outros compostos por HPLC.

Tabela 3 – Volume de enzimas adicionado por ensaio.

Ensaio	Volume adicionado (mL)	% p/v
Sem enzimas	0	0
Celluclast	0,032	0,26
Alfa-amilase	0,01	0,08
Complexo	0,011	0,09
Celluclast e Alfa-amilase	0,042	0,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

Determinação da concentração dos açúcares e outros compostos após hidrólise enzimática

A quantificação dos açúcares (Glicose, Xilose, Celobiose), ácidos orgânicos (Ácido acético, Ácido fórmico), furfural e HMF após pré-tratamento por ultrassom e hidrólise enzimática foram analisadas no equipamento *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). O HPLC tem a vantagem de não ocorrer derivatização e uma separação isocrática simples com ácido sulfúrico (H_2SO_4) como fase móvel. Com os resultados obtidos, é possível comparar e avaliar quais condições favoreceram a maior liberação de açúcares. A identificação e quantificação dos picos cromatográficos das amostras foram realizadas comparando-se os tempos de retenção com padrões autênticos. A análise estatística foi feita utilizando o software Microcal Origin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA) por meio de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade das enzimas utilizadas neste trabalho

As atividades enzimáticas foram determinadas conforme os protocolos descritos na metodologia para cada enzima. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Atividade das enzimas utilizadas.

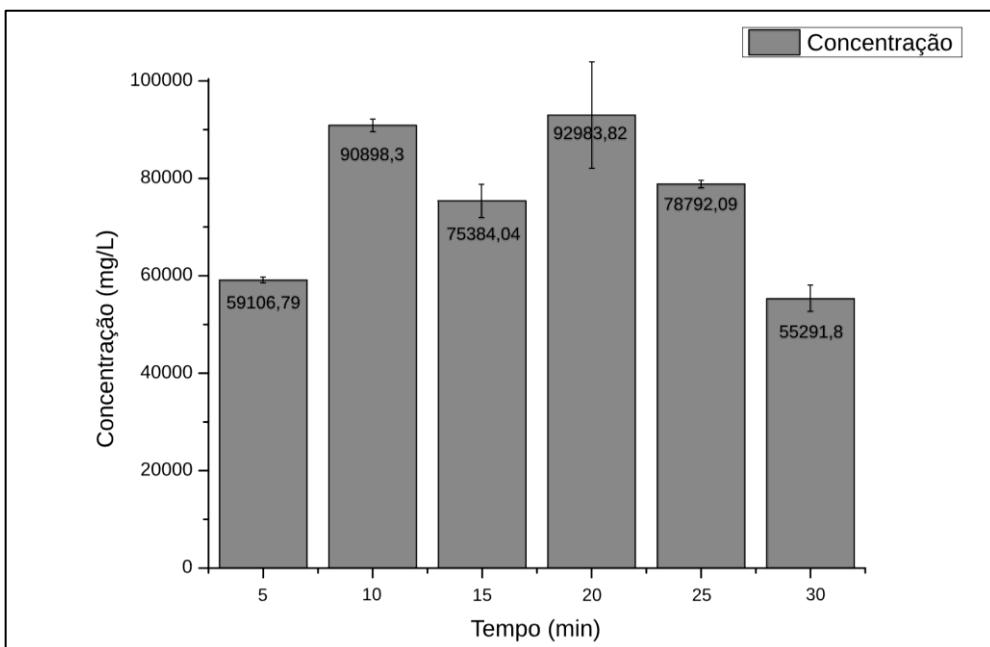
Enzima	Atividade
Celluclast	77,45 (FPU/mL)
Alfa-amilase	1228,27 (U/mL)
Amilo-glucosidase (Complexo)	1164,1 (U/mL)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Concentração dos açúcares redutores no resíduo pré-tratado por ultrassom

A concentração de açúcares presente no resíduo pré-tratado por ultrassom em cinco tempos distintos (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) está descrita no gráfico 1.

Gráfico 1 - Concentração de açúcares redutores no resíduo pré-tratado por ultrassom.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo os dados obtidos, os tempos que demonstraram melhor eficiência de pré-tratamento foram as amostras de 10 e 20 minutos, que apresentaram concentrações de 90.898 mg/L e 92.984 mg/L de açúcares redutores, respectivamente. Tal parâmetro é relevante pois, os açúcares serão convertidos em CH₄ e CO₂ por meio da digestão anaeróbia de organismos para liberação de biogás (EDWINGES, 2019). Devido a isso, os tempos de 10 e 20 minutos foram utilizados para a realização da hidrólise enzimática.

O aumento na liberação de açúcares nesses tempos pode estar relacionado ao colapso e cavitação mais eficiente das microbolhas promovidas pelo ultrassom, o que intensifica a desestruturação da matriz lignocelulósica. Essa ruptura facilita a solubilização de frações polissacarídicas e a liberação de monossacarídeos e oligossacarídeos. Por outro lado, tempos superiores a 20 minutos apresentaram queda na concentração de açúcares redutores, o que pode estar associado a possíveis efeitos de degradação térmica, recomposição de ligações ou saturação do processo físico.

4.3 Concentração dos açúcares e outros compostos após hidrólise enzimática

A concentração dos açúcares (glicose, xilose e celobiose), ácidos orgânicos (acético e fórmico), HMF e furfural do resíduo sem ultrassom e pré-tratado com ultrassom seguido de hidrólise enzimática foram avaliados por HPLC.

Em geral, os resíduos pré-tratados com tempo de ultrassom de 10 minutos apresentaram desempenho superior ao pré-tratamento de 20 minutos, com diferenças significativas para os açucares como glicose e xilose. Esse comportamento sugere que o tempo prolongado de exposição ao ultrassom (20 minutos) pode ter promovido a degradação excessiva da matriz lignocelulósica. Assim, o tempo de 10 minutos mostrou-se mais eficiente, equilibrando a desestruturação da biomassa e a minimização de perdas por degradação.

A combinação das enzimas Celluclast e α -amilase destacou-se entre os tratamentos testados, promovendo a maior liberação de glicose no resíduo pré-tratado por ultrassom durante 10 minutos. Esse resultado é especialmente relevante, considerando que, em processos industriais para produção de biocombustíveis, a glicose é o principal açúcar-alvo (CHENG *et al.* (2008).

4.3.1 Avaliação da liberação de glicose

Tabela 5 – Concentração de glicose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	13.288,01 ^{b,c}	4.624,88 ^a
Celluclast	14.124,47 ^{b,c}	11.018,54 ^b
Alfa-amilase	14.064,80 ^{b,c}	5.379,10 ^a
Complexo	15.332,12 ^c	5.341,76 ^a
Celluclast e Alfa-amilase	18.494,73 ^c	9.532,39 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. Concentração inicial no resíduo sem pré-tratamento de 3.929,06 (mg/L).
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O resíduo pré-tratado com ultrassom por um período de 10 minutos, combinado com as enzimas Celluclast e alfa-amilase, apresentou a maior liberação de glicose (18.494,73 mg/L), superando o ensaio sem adição de enzimas com o resíduo pré-tratado por 10 e 20 minutos (13.288,01 mg/L e 4.624,88 mg/L, respectivamente) e com a concentração inicial do resíduo sem ultrassom (3.929,06 mg/L). A aplicação apenas da enzima Celluclast resultou em menores concentrações de glicose, com 14.124,47 mg/L para o resíduo pré-tratado por 10 minutos e 11.018,54 mg/L para o resíduo pré-tratado por 20 minutos. Esse desempenho inferior está relacionado à composição do resíduo, formado por vegetais com a presença de amido como milho, batata inglesa, banana, abóbora e cenoura. Nesses casos, a presença da alfa-amilase foi fundamental para a quebra do amido, contribuindo para o aumento da liberação de glicose no ensaio com a combinação de enzimas.

Comparativamente, Subhedar *et al.*, (2013) relataram uma produção de 12.230 mg/L a partir da hidrólise enzimática assistida por ultrassom de biomassa de jornal deslignificado, utilizando celulase a 0,14% (p/v). A diferença obtida nos estudos pode estar relacionada à maior concentração de enzima aplicada, mas também à as condições diferentes do pré-tratamento por ultrassom utilizadas e à composição particular do resíduo agroindustrial utilizado. Em comparação a outro método de pré-tratamento, Cheng *et al.* (2008) a partir do bagaço de cana, uma biomassa também lignocelulósica, obtiveram após a hidrólise ácida (1,25% H₂SO₄, 121°C, 2 horas) 9.200 mg/L de glicose.

4.3.2 Avaliação da liberação de xilose

Tabela 6 – Concentração de xilose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	13.762,06 ^b	5.997,58 ^c
Celluclast	11.203,03 ^d	4.457,33 ^{c,e}
Alfa-amilase	13.311,52 ^b	5.499,33 ^{c,e}
Complexo	13.003,42 ^{b,d}	6.226,51 ^c
Celluclast e Alfa-amilase	13.665,22 ^b	3.798,31 ^c

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. Concentração inicial no resíduo sem pré-tratamento de 865,72 (mg/L).
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os dados obtidos indicam que a liberação de xilose ocorreu predominantemente na etapa do pré-tratamento por ultrassom. A concentração inicial desse açúcar no resíduo sem ultrassom era de 865,72 mg/L, aumentando, após o pré-tratamento e hidrólise sem adição de enzimas para 13.762,06 mg/L no resíduo pré-tratado por 10 minutos e 5.997,58 mg/L no resíduo pré-tratado por 20 minutos. Não ocorrendo um aumento significativo com a adição de enzimas, o que pode ser atribuído à complexidade da estrutura de hemicelulose. Por ser formada por diversos compostos necessita de uma variedade de enzimas para sua degradação eficiente. Como os ensaios enzimáticos neste estudo não incluíram hemicelulases, como xilase, β -xilosidase, arabinofuranosidase, entre outras, não foi observada uma liberação expressiva de xilose durante a hidrólise enzimática.

Destaca-se, contudo, a eficácia do ultrassom no rompimento da matriz hemicelulósica. A aplicação do ultrassom como método de pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas também é corroborada por estudos anteriores. Kapoor *et al.*, (2020), observaram um aumento de até três vezes no rendimento de açúcares redutores após a aplicação de ultrassom em bagaço de cana-de-açúcar, uma biomassa de segunda geração com composição estrutural semelhante à do resíduo utilizado neste estudo. Esses resultados reforçam o potencial do ultrassom como ferramenta eficaz na desestruturação da parede celular e na exposição das frações hemicelulósica e celulósica para posterior conversão bioquímica.

Ao comparar os dois tempos de ultrassom avaliados (10 e 20 minutos), observou-se que o tempo de 10 minutos foi mais eficiente na quebra da estrutura hemicelulósica. Isso pode

estar relacionado à possível degradação da xilose durante o tempo mais prolongado de exposição, levando à formação de compostos inibidores, como furfural – subproduto da degradação de pentoses presentes na hemicelulose (DULIE *et al.*, 2021). Dessa forma, o tempo prolongado de ultrassom pode ter contribuído para diminuição final da xilose, em função da formação de subprodutos indesejáveis.

4.3.3 Avaliação da liberação de celobiose

Tabela 7 – Concentração de celobiose após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	308,64 ^a	2.017,12 ^b
Celluclast	1.935,46 ^b	6.790,11 ^c
Alfa-amilase	-	3.899,81 ^d
Complexo	1.207,20 ^b	4.797,36 ^e
Celluclast e Alfa-amilase	1.671,54 ^b	7.113,16 ^c

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. O resíduo sem pré-tratamento não apresentou concentração inicial de celobiose.
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os resultados da liberação de celobiose demonstram a maior liberação com a utilização do resíduo pré-tratado por 20 minutos, especialmente com a adição da enzima Celluclast, isoladamente (6.790,11 mg/L) ou em combinação com alfa-amilase (7.133,16 mg/L), não apresentando diferença significativa na liberação de celobiose. Evidenciando, como esperado, que o uso da celulase é suficiente para promover a sacarificação da celulose, resultando na formação de celobiose, já que este complexo celulolítico apresenta enzimas como a Exoglucanases, capaz de degradar a cadeia celulósica em moléculas de celulose.

Em relação ao resíduo pré-tratado por 10 minutos ocorreu a liberação inferior ao tempo de 20 minutos de exposição, com os ensaios com as enzimas Celluclast (1.935,46 mg/L), complexo enzimático (1.207,20 mg/L) e combinação das enzimas Celluclast e alfa-amilase (1.671,54 mg/L) não apresentando diferenças significativas entre si. Esses resultados sugerem que a liberação de celobiose pode ser favorecida por um tempo maior de pré-tratamento por ultrassom, o qual pode ter promovido uma maior desestruturação da matriz celulósica, aumentando a acessibilidade das enzimas ao substrato.

4.3.4 Avaliação da liberação de ácido acético

Tabela 8 – Concentração de ácido acético após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	154,56 ^b	293,76 ^c
Celluclast	170,85 ^b	371,86 ^d
Alfa-amilase	157,16 ^b	273,54 ^c
Complexo	172,65 ^b	321,71 ^{c,d}
Celluclast e Alfa-amilase	201,86 ^b	343,12 ^{c,d}

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. Concentração inicial no resíduo sem pré-tratamento de 89,45 (mg/L).
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O ácido acético é produto intermediário ou final da degradação de açúcares e componentes estruturais da biomassa e afetam diretamente a etapa digestão anaeróbia, em que altas concentrações de ácidos voláteis podem inibir o crescimento dos microrganismos anaeróbios (ALVEZ, 1994). O ácido acético pode ser liberado principalmente pela desacetilação da hemicelulose, com a remoção de grupos acetilados presentes na sua estrutura. Além disso, outras vias de formação incluem a degradação térmica ou química de açúcares durante o pré-tratamento. O ácido acético também pode se originar da decomposição de compostos intermediários, como furfural e HMF, sob condições ácidas ou aquecidas (NUNES, 2011).

A concentração inicial do ácido acético no resíduo sem ultrassom foi de 89,45 mg/L, valor considerado baixo, compatível com resíduos vegetais frescos, cuja estrutura lignocelulósica ainda não foi significativamente desestabilizada. O resíduo pré-tratado por ultrassom por 10 minutos seguido da hidrólise, observou-se um aumento para 145,56 mg/L no ensaio sem enzimas e concentrações variando entre 170,85 mg/L a 201,86 mg/L para os ensaios com a utilização de enzimas, sem apresentar uma diferença significativa entre esses valores. Para o resíduo pré-tratado por ultrassom por 20 minutos seguido da hidrólise, observou-se um aumento para 293,76 mg/L no ensaio sem enzimas e concentrações variando entre 273,54 mg/L a 371,86 mg/L para os ensaios com a utilização de enzimas. Apresentando diferença significativa apenas nos ensaios com a utilização do complexo enzimático e a combinação das enzimas Celluclast e alfa-amilase (321,71 mg/L e 343,21 mg/L,

respectivamente). Esse incremento está relacionado à liberação de grupos acetilados, presentes na hemicelulose, promovida pela ação física do ultrassom, que rompe a parede celular e facilita a solubilização desses componentes.

4.3.5 Avaliação da liberação de compostos inibitórios

Tabela 9 – Concentração de hidroximetilfurfural (HMF) após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	1.357,50 ^{b,c}	-
Celluclast	1.320,00 ^{b,c}	-
Alfa-amilase	1.235,00 ^c	-
Complexo	1.320,00 ^{b,c}	-
Celluclast e Alfa-amilase	1.640,00 ^b	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. Concentração inicial no resíduo sem pré-tratamento de 22,39 (mg/L).
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Concentração de furfural após hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado por ultrassom (10 e 20 min).

Condição	Pré-tratado por 10 min (mg/L)	Pré-tratado por 20 min (mg/L)
Sem enzimas	797,50 ^b	-
Celluclast	895,00 ^{b,c}	-
Alfa-amilase	870,00 ^b	-
Complexo	1.050,00 ^c	-
Celluclast e Alfa-amilase	1.125,00 ^c	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota:

1. Concentração inicial no resíduo sem pré-tratamento de 21,28 (mg/L).
2. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Embora a combinação das enzimas Celluclast e alfa-amilase tenha promovido a maior liberação de glicose, essa mesma condição também resultou nas maiores concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (1.640 mg/L e 1.125 mg/L, respectivamente). Esses compostos são reconhecidos como inibidores da atividade microbiana, especialmente em

processos de digestão anaeróbia e fermentação. De acordo com Muñoz-Páez (2019), tais inibidores podem induzir diversos efeitos negativos nos microrganismos, como redução da taxa de crescimento celular, interferência na atividade de enzimas glicolíticas e fermentativas, diminuição da permeabilidade da membrana, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), quebras de DNA e inibição da síntese de proteínas e RNA. Esses compostos são gerados a partir da quebra da matriz lignocelulósica em açúcares simples. Todos os ensaios enzimáticos com tempo de duração de 10 minutos foram detectados esses compostos. Apesar de se esperar maior formação desses compostos nos ensaios com 20 minutos de ultrassom, esses compostos inibidores não foram detectados nessas condições.

A formação de compostos inibitórios como o HMF pode estar associada às condições térmicas geradas durante o pré-tratamento ultrassônico. Segundo Önür *et al.*, (2018), o aquecimento pode favorecer a geração de 5-hidroximetilfurfural (HMF), como ocorre durante a sonicação, devido ao processo de cavitação, onde ocorre a formação, crescimento e colapso violento de microbolhas, podendo chegar a temperaturas locais de até 4326 °C (FLINT; SUSLICK, 1991). Em estudo com amostras de mel Önür *et al.*, 2018, observaram um aumento na formação de HMF durante o tratamento com ultrassom, sobretudo na presença de elevação de temperatura. Apesar disso, os níveis de HMF foram significativamente menores em comparação aos obtidos por aquecimento convencional. Estudos anteriores sugerem que o controle da temperatura durante a sonicação, por meio de resfriamento, pode ajudar a minimizar a formação de HMF.

No presente estudo, a formação de HMF e furfural após o pré-tratamento com ultrassom também foi evidente. A concentração de furfural aumentou de 21,28 mg/L no resíduo sem ultrassom para 797,50 mg/L após o ultrassom, com incremento discreto em ensaios com a adição de enzimas, como a Celluclast (895,00 mg/L). Para o HMF, observou-se um aumento de 22,39 mg/L no resíduo sem ultrassom para 1.357,50 mg/L após o ultrassom, mantendo-se em nível semelhante mesmo após a adição da enzima Celluclast (1.320,00 mg/L). Esses resultados reforçam a hipótese de que o aumento da temperatura local durante a cavitação no ultrassom pode induzir a degradação de açúcares liberados, contribuindo para a formação desses compostos, mesmo antes da ação enzimática.

5. CONCLUSÃO

Diante do objetivo proposto — Avaliação do efeito do pré-tratamento ultrassom e hidrólise enzimática em resíduos agroindustriais para otimização da liberação de açúcares fermentescíveis. — Os resultados obtidos indicam que os tempos de 10 e 20 minutos de exposição ao ultrassom foram eficazes na ruptura da matriz lignocelulósico, favorecendo a posterior conversão em açúcares fermentescíveis. Em relação à hidrólise enzimática, observou-se que o resíduo pré-tratado por 10 minutos apresentou melhor desempenho na liberação de açúcares em comparação ao de 20 minutos, em destaque para a combinação das enzimas Celluclast e alfa-amilase. Tais resultados demonstram o potencial do ultrassom como um pré-tratamento promissor para materiais lignocelulósico, favorecendo a liberação de açúcares fermentescíveis. No entanto, essa mesma condição resultou na maior formação de compostos inibidores, como HMF e furfural.

Ademais, as limitações observadas sugerem para futuros estudos que se considerem: o monitoramento contínuo da temperatura durante o tratamento ultrassom, a realização da hidrólise enzimática com enzimas capazes de degradar a hemicelulose, além de ensaios enzimáticos com diferentes concentrações, a fim de avaliar a liberação de açúcares nessa etapa, com objetivo de favorecer ainda mais a liberação de açúcares e sua posterior integração a sistemas fermentescíveis, contribuindo para o desenvolvimento de biocombustíveis a partir de resíduo agroindustrial.

REFERÊNCIAS

AGBOR, Valery B. *et al.*, **Biomass pretreatment: fundamentals toward application.** Biotechnology advances, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.

ALVES, Denise Maria Gândara. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, Luiz Paulo C. **Análise das evidenciações de sustentabilidade nos relatórios da neoenergia: um enfoque sobre a energia eólica na Bahia.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Bahia. 2023

BACH, W. **Fossil fuel resources and their impacts on environment and climate.** International Journal of Hydrogen Energy, v. 6, n. 2, p. 185-201, 1981.

BEHERA, Shuvashish *et al.*, **Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass.** Renewable and sustainable energy reviews, v. 36, p. 91-106, 2014.

BENDER, Martin H. Conservação potencial de biomassa na produção de orgânicos sintéticos. Recursos, Conservação e Reciclagem, v. 30, n. 1, p. 49-58, 2000.

BISCHOF, Robert H.; RAMONI, Jonas; SEIBOTH, Bernhard. **Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*.** Microbial cell factories, v. 15, n. 1, p. 106, 2016.

BUSSEMAKER, Madeleine J.; ZHANG, Dongke. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 10, p. 3563-3580, 2013.

CASTRO, A.M, JUNIOR, N.P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CHANDEL, Anuj; DA SILVA, Silvio Silverio (Ed.). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization.** BoD–Books on Demand, 2013.

CHENG, Ke-Ke *et al.*, Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

COCA, Brisabella Clara Corbolan. **Otimização da produção e caracterização de α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*.** 2022.

DECLERCK, Nathalie et al. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Journal of Molecular Biology*, v. 301, n. 4, p. 1041-1057, 2000.

DONAGEMMA, Guilherme Kangussu et al., **Caracterização, potencial agrícola e perspectivas de manejo de solos leves no Brasil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, p. 1003-1020, 2016.

DUARTE, Victória Huch et al., **Biocombustíveis: uma revisão sobre o panorama histórico, produção e aplicações do biodiesel.** *Meio Ambiente (Brasil)*, v. 4, n. 2, 2022.

DULIE, Negesso Wakushie et al. **An Insight into the Valorization of Hemicellulose Fraction of Biomass into Furfural: Catalytic Conversion and Product Separation.** *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, n. 2, p. 531–552, 4 fev. 2021.

EDWIGES, Thiago et al., **Comparison of various pretreatment techniques to enhance biodegradability of lignocellulosic biomass for methane production.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 6, p. 103495, 2019.

FAN, Yao-Ting et al., **Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost.** *Bioresource Technology*, v. 97, n. 3, p. 500-505, 2006.

FERREIRA, V. **Produção De B-Glucosidase Em *Saccharomyces Cerevisiae* Recombinante E Avaliação De Seu Emprego No Processo De Hidrólise Enzimática Simultânea À Fermentação Para A Produção De Etanol De Segunda Geração.** Rio de Janeiro, 2010.

FLINT, Edward B.; SUSLICK, Kenneth S. **The temperature of cavitation.** *Science*, v. 253, n. 5026, p. 1397-1399, 1991.

FORTUNATI, Elena et al., **Extração de materiais lignocelulósicos de resíduos. Nanocompósitos poliméricos multifuncionais baseados em reforços celulósicos,** p. 1-38, 2016.

GABRIEL, Juliana Ribeiro. **Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

GALBE, Mats; ZACCHI, Guido. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*, v. 46, p. 70-78, 2012.

GODOY, Mateus G. et al. **Agricultural residues as animal feed: protein enrichment and detoxification using solid-state fermentation.** In: *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2018. p. 235-256.

GUPTA, Rani et al. **Microbial α -amylases: a biotechnological perspective.** *Process biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAZRAT, M. A. et al., A mini review on the cold flow properties of biodiesel and its blends. *Frontiers in Energy Research*, v. 8, p. 598651, 2020.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, Grietje. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource technology*, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. **Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects.** *Bioresource technology*, v. 199, p. 103-112, 2016.

KAPOOR, K., TYAGI, AK, DIWAN, RK. Efeito da irradiação gama na recuperação de Açúcares redutores totais do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado. *Radiat. Phys. Chem.* 170, 2020

KENTISH, Sandra; ASHOKKUMAR, Muthupandian. **The physical and chemical effects of ultrasound.** In: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 1-12.

KIM, Kyoung Heon; HONG, Juan. **Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis.** *Bioresource technology*, v. 77, n. 2, p. 139 2001.

KUBICEK, Christian P. **The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation.** In: *Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1-27.

KUMAR, Parveen et al., **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.** *Industrial & engineering chemistry research*, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMARI, Dolly; SINGH, Radhika. **Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 90, p. 877-891, 2018.

LAJOLO, Franco Maria; MENEZES, Elizabete Wenzel de. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos.** In: Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. 2006. p. 646-646.

LIMA, Francisca Luana Alves de. **Aproveitamento de resíduos de frutos na elaboração de hambúrgueres com potencial nutritivo: uma revisão.** 2021.

LIU, Hui-Qin et al. **Evaluation of cellulases produced from four fungi cultured on furfural residues and microcrystalline cellulose.** Biodegradation, v. 23, n. 3, p. 465-472, 2012.

LUCARINI, Adriana Célia et al., **Estudo da Hidrólise Enzimática da Palha da cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração.** The Journal of Engineering and Exact Sciences, v. 3, n. 2, p. 242-253, 2017.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS.** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. (Comunicado Técnico, 85).

MARTINI, Paulo Roberto Rodrigues et al., **Conversão pirolítica de bagaço residual da indústria de suco de laranja e caracterização química dos produtos.** 2009.

MARTINS, Rodrigo Pagano. **Extração de hemicelulose e açúcares fermentáveis do bagaço, colmo e folha do sorgo sacarino.** 2020.

MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JÚNIOR, Miguel. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

MITSUHARA, Ariane Tiemi; MORAES, Jheyce Cristina; CRESTANI, Carlos Eduardo. **Caracterização química do bagaço de laranja: potencial rota para uso desse resíduo.** Revista Principia, v. 62, 2025.

MOOD, Sohrab Haghghi et al., **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment.** Renewable and sustainable energy reviews, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOSIER, Nathan *et al.*, **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresource technology, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOURA, Adriane. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira.** 2012. Tese de Doutorado. Dissertation, Universidade Federal de Santa Catarina.

MOYA, Eva Balaguer *et al.*, **Enzymatic hydrolysis cocktail optimization for the intensification of sugar extraction from sugarcane bagasse.** International journal of biological macromolecules, v. 242, p. 125051, 2023.

MUSTAFA, Balat; HAWA, Balat; CAHIDE, Oz. **Progressin bioethanol processing Progress in Energy and Combustion.** Progress in Energy and Combustion Science, p. 1-23, 2008.

MÜLLER, Julia de Oliveira Martins *et al.*, **Revisão bibliográfica: Métodos de Conversão de Resíduos Agroindustriais em Biocombustíveis.** International Journal of Agrarian Sciences-PDVAGRO, v. 2, n. 2, p. 115-134, 2023.

MUÑOZ-PÁEZ, Karla M. *et al.*, **Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture.** International Journal of Hydrogen Energy, v. 44, n. 4, p. 2289-2297, 2019.

NASCIMENTO, Viviane Marcos. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de açúcar para a produção de etanol e obtenção de xiloooligômeros.** 2011.

NIGAM, Poonam; SINGH, Dalel. **Enzyme and microbial systems involved in starch processing.** Enzyme and Microbial Technology, v. 17, n. 9, p. 770-778, 1995.

NUNES, Bruno Rafael Pereira et al. **Remoção de furfural e HMF, produzido na hidrólise ácida de biomassas lignocelulólicas, por adsorção.** 2011.

ÖNÜR, İpek *et al.*, **Effects of ultrasound and high pressure on physicochemical properties and HMF formation in Turkish honey types.** Journal of Food Engineering, v. 219, p. 129-136, 2018.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Víctor Manuel *et al.*, **Approach to biodiesel production from microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method.** Fuel processing technology, v. 191, p. 211-222, 2019.

OURIQUE, Laura Jensen. **Avaliação dos métodos de pré-tratamento para casca e palha de arroz: uma revisão bibliográfica.** 2016.

PANDEY, Ashok et al. **Advances in microbial amylases.** Biotechnology and applied biochemistry, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G.; KOLEV, D.N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain Trichoderma sp. M7.** Biotechnology Letters. v, 24, p. 2104-2111, 2002.

PIELHOP, Thomas *et al.*, **Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility.** Biotechnology for Biofuels, v. 9, p. 1-13, 2016.

PINJARI, Dipak Vitthal; PANDIT, Aniruddha B. **Cavitation milling of natural cellulose to nanofibrils.** Ultrasonics sonochemistry, v. 17, n. 5, p. 845-852, 2010.

PONNUSAMY, Vinoth Kumar *et al.*, **A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential.** Bioresource technology, v. 271, p. 462-472, 2019.

POVEY, Malcolm JW; MASON, Timothy J. (Ed.). **Ultrasound in food processing.** Springer Science & Business Media, 1998.

RABEMANOLONTSOA, Harifara; SAKA, Shiro. **Various pretreatments of lignocellulosics.** Bioresource technology, v. 199, p. 83-91, 2016.

RAVINDRAN, Rajeev; JAISWAL, Amit K. **Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review.** Bioengineering, v. 3, n. 4, p. 30, 2016.

RODRIGUES, Clarissa Perdomo; CAMARGO, Juliana Alves. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para cogeração de energia elétrica e etanol celulósico.** São Joaquim da Barra: Iara Coimbra, 2008

RUNGRATTANAKASIN, B., PREMJET, S., THANONKEO, S., KLANRIT, P. e THANONKEO, P. **Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus Aspergillus fumigatus DBiNU-1 in Kluyveromyces lactis.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 49, p. 647–655, 2018.

SÁNCHEZ, Carmen. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi.** Biotechnology advances, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SHIRKAVAND, Ehsan *et al.*, **Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 54, p. 217-234, 2016.

SHLESER, R. **Ethanol Production in Hawaii.** State of Hawaii, Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism, Honolulu, 1994.

SUBHEDAR, Preeti B.; GOGATE, Parag R. **Intensificação da hidrólise enzimática de lignocelulose usando ultrassom para produção eficiente de bioetanol: uma revisão.** Pesquisa em Química Industrial e de Engenharia, v. 52, n. 34, p. 11816-11828, 2013.

SUBRAMANIAM, Yogeeswari; MASRON, Tajul Ariffin; AZMAN, Nik Hadiyan Nik. **Biofuels, environmental sustainability, and food security: A review of 51 countries.** Energy Research & Social Science, v. 68, p. 101549, 2020.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource technology, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUSLICK, K. S. **The chemical effects of ultrasound.** Scientific American 1989, 2, 80.

SYAFIUDDIN, Achmad *et al.*, **The current scenario and challenges of biodiesel production in Asian countries: A review.** Bioresource Technology Reports, v. 12, p. 100608, 2020.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. **Starch - composition, fine structure and architecture.** Journal of cereal science, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

VAN DER MAAREL, Marc JEC et al. **Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family.** Journal of biotechnology, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VILKHU, Kamaljit *et al.*, **Ultrasonic recovery and modification of food ingredients.** In: Ultrasound technologies for food and bioprocessing. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 345-368.

VOHRA, M. *et al.*, **Bioethanol production: Feedstock and current technologies**Journal of Environmental Chemical Engineering. 2014.

WILSON, D.B. **Three microbial strategies for plant cell wall degradation.** Annals of the New York Academy of Sciences. v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

YU, Lingyu; GIURGIUTIU, Victor. **Multi-mode damage detection methods with piezoelectric wafer active sensors.** Journal of intelligent material systems and structures, v. 20, n. 11, p. 1329-1341, 2009.

ZHENG, Yizhou *et al.*, **Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis.** Biotechnology Letters, v. 17, p. 845-850, 1995.