

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

BIORREFINARIA DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA:
PROCESSOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS PARA A GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS

CURITIBA

2023

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

BIORREFINARIA DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA:
PROCESSOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS PARA A GERAÇÃO DE
BIOPRODUTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Maroldi, Wédisley Volpato

Biorrefinaria de resíduos da agroindústria brasileira: processos químicos e enzimáticos para a geração de bioprodutos / Wédisley Volpato Maroldi. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk

Coorientador: Giselle Maria Maciel

1. Sustentabilidade. 2. Compostos fenólicos. 3. Açúcares (Química orgânica). 4. Celulases. 5. Lacases. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. IV. Maciel, Giselle Maria. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

ATA Nº2052

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

No dia quatorze de setembro de dois mil e vinte e três às 08:30 horas, na sala Auditorio I do DEQ, Auditorio I do DEQ - Defesa Híbrida, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI**, intitulada: **Biorrefinaria de resíduos da agroindústria brasileira: processos químicos e enzimáticos para a geração de bioprodutos**, sob orientação do Prof. Dr. **CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**, **CRISTIANE VIEIRA HELM (EMBRAPA FLORESTAS)**, **MARCUS VINICIUS DE LIZ (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)**, **ANA PAULA STAFUSSA (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)**, **THAISA CARVALHO VOLPE BALBINOTI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL)**. A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 14 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica
22/09/2023 20:50:54.0
CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/10/2023 09:47:00.0
CRISTIANE VIEIRA HELM
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica
22/09/2023 16:37:11.0
MARCUS VINICIUS DE LIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
22/09/2023 21:29:46.0
ANA PAULA STAFUSSA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica
22/09/2023 20:25:07.0
THAISA CARVALHO VOLPE BALBINOTI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO
SUL)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI** intitulada: **Biorrefinaria de resíduos da agroindústria brasileira: processos químicos e enzimáticos para a geração de bioprodutos**, sob orientação do Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

22/09/2023 20:50:54.0

CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

17/10/2023 09:47:00.0

CRISTIANE VIEIRA HELM
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica

22/09/2023 16:37:11.0

MARCUS VINICIUS DE LIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/09/2023 21:29:46.0

ANA PAULA STAFUSSA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

22/09/2023 20:25:07.0

THAISA CARVALHO VOLPE BALBINOTI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO
SUL)

***Dedico este trabalho a Deus por ter sido
meu guia ao longo desta jornada.
Agradeço também a meus professores,
minha família e aos meus colegas que
fizeram parte desta etapa de minha vida.***

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter guiado e iluminado o caminho percorrido todos os dias de minha vida, sempre no foco.

Agradeço ao professor Charles Windson Isidoro Haminiuk por todos os anos de aprendizado, desde as disciplinas base da graduação e do mestrado, quanto na orientação ao longo destes anos de doutorado. Tenho muito orgulho de mencioná-lo como um dos responsáveis pelo meu crescimento, principalmente pela confiança depositada, pelos conselhos dados e pela paciência cultivada. És uma referência de dedicação e amor ao trabalho, tanto na pesquisa quanto aos pesquisadores.

Agradeço também à professora Giselle Maria Maciel, pela perseverança e inteligência no decorrer do trabalho, guiando, corrigindo, sugerindo e se preocupando, tanto em laboratório, quanto o aspecto pessoal, durante todo o planejamento e execução de trabalhos em laboratório e nos artigos, quanto nas disciplinas ministradas com maestria.

Fico imensamente agradecido à minha família, meu pai José Aparecido Gomes Maroldi por todo o apoio e minha mãe Eunice Volpato Maroldi por todo o suporte, tanto nos momentos de felicidade quanto nos momentos difíceis, segurando minha mão e me dando força para seguir, mesmo diante das maiores dificuldades.

Agradeço também a todos meus amigos, em especial à Thainnane Paiva, por estar sempre ao lado, rindo, chorando, discutindo, propondo, sugerindo e avançando nessa etapa conquistada.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Paraná e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo espaço cedido para a realização dos trabalhos e ao CNPQ pela oportunidade de executar todas as atividades perante este trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” (José de Alencar).

***“Se você é uma daquelas pessoas
que tem a habilidade de descer até o fundo do oceano,
a capacidade de nadar nas águas escuras sem medo,
a incrível capacidade de passar pelos piores cadinhos da vida e não morrer,
então você também tem a capacidade de trazer algo de volta à superfície
que ajuda os outros de uma forma que eles não conseguem alcançar”***

Lidia Yuknavitch, The Misfit's Manifesto

RESUMO

Nos últimos anos, a biorrefinaria de biomassa lignocelulósica destaca-se como uma opção sustentável e viável para a produção de biocombustíveis e produtos químicos de interesse industrial. Contudo, a conversão das biomassas lignocelulósicas em bioprodutos envolve tratamentos, como os físicos, químicos, biológicos ou a associação entre eles. Cada processo de tratamento selecionado deve ser adaptado às características da biomassa a ser utilizada (composição química e estrutural) para um rendimento ótimo em produtos, assim como atender a aspectos econômicos e metas ambientais. Neste trabalho, o efeito de pré-tratamentos químicos e enzimáticos (individuais e combinados) foi avaliado na geração de bioprodutos, como açúcares redutores e compostos fenólicos, a partir da casca de arroz, bagaço de cana, bagaço de uva e casca de jaboticaba. As biomassas foram caracterizadas por métodos físico-químicos, espectrométricos (FTIR) e de microscopia (MEV) antes e após os tratamentos. As frações líquidas foram avaliadas espectrofotometricamente e cromatograficamente. As biomassas apresentaram grande variação percentual de lignina e carboidratos (celulose e hemicelulose) em sua composição estrutural. A casca de jaboticaba apresentou a menor porcentagem de lignina (11,92%) e a maior de carboidratos (70,08%). O bagaço de cana apresentou a maior porcentagem de lignina (20,96%), e a casca de arroz a menor porcentagem de carboidratos (59,02%), similar àquela encontrada no bagaço de cana (59,85%). Após os tratamentos químicos (alcalino e solvente/ácido) das matrizes e análise cromatográfica das frações líquidas, observou-se que: (a) o bagaço de uva foi a melhor fonte de ácido gálico, epicatequina e procianidina B2; (b) a casca de arroz apresentou as maiores concentrações de quercetina-3, ácido elágico, ácido caféico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, naringina e catequina, (c) o bagaço de cana liberou as maiores concentrações de ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico. A casca de jaboticaba e o bagaço de uva foram as fontes mais significativas de açúcares redutores após o tratamento químico alcalino (6,7 e 6,25 g L⁻¹, respectivamente). O tratamento enzimático com lacases aplicado nas biomassas resultantes do tratamento alcalino demonstrou que a remoção de lignina foi maior em condições tamponadas (pH 5,0). A sacarificação enzimática das amostras previamente tratadas com lacases foi geralmente mais eficiente nas condições com

as maiores atividades de lacases (1 U mL^{-1}) e celulasas (10 U mL^{-1}). A casca de jaboticaba e o bagaço de cana tratados em reação alcalina e enzimaticamente (processo não simultâneo com lacases e celulasas) apresentaram a maior liberação de açúcares redutores ($12,44$ e $12,41 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente). Em um processo simultâneo de tratamento das biomassas com lacases e celulasas, observou-se um efeito negativo na liberação de açúcares redutores, principalmente no bagaço de uva e casca de jaboticaba, podendo estar relacionado a alterações estruturais causadas pelas lacases na fração de celulose. Os tratamentos químicos e biológicos avaliados neste trabalho evidenciam o potencial de resíduos da agroindústria brasileira para obtenção de compostos fenólicos bioativos (os quais podem ser direcionados para segmentos das indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos) e açúcares para processos fermentativos. Os métodos enzimáticos aplicados individualmente podem contribuir de forma “verde” para o tratamento e valorização de biomassas.

Palavras-chave: sustentabilidade; compostos fenólicos; açúcares redutores; lacases; celulasas.

ABSTRACT

In recent years, the lignocellulose biomass biorefinery has emerged as a sustainable and viable option to produce biofuels and chemicals of industrial interest. However, the conversion of lignocellulose biomass into bioproducts involve treatment systems, such as physical, chemical, biological or a combination of them. Each treatment process must be adapted to the characteristics of the biomass to be used (chemical and structural composition) for optimal yield in products, as well as meet economic aspects and environmental goals. In this work, the effect of chemical and enzymatic pre-treatments (individual and combined) was evaluated on the generation of bio-products, such as renewable sugars and phenolic compounds, from rice husks, sugarcane bagasse, grape pomace and jaboticaba peels. The biomasses were characterized by physicochemical, spectrometric (FTIR) and microscopic (MEV) methods before and after the treatments. Liquid fractions were evaluated spectroscopically and chromatographically. The biomasses showed great variation in the percentage of lignin and carbohydrates (cellulose and hemicellulose) in their structural composition. The peels of jaboticaba presented the lowest percentage of lignin (11.92%) and the highest amount of carbohydrates (70.08%). Sugarcane bagasse had the highest percentage of lignin (20.96%), and rice husks had the lowest percentage of carbohydrates (59.02%), like that found in sugarcane bagasse (59.85%). After chemical treatments (alkaline and solvent/acid) of the matrices and chromatographic analysis of the liquid fractions, it was observed that: (a) grape pomace was the best source of gallic acid, epicatechin and procyanidine B2; (b) rice husks showed the highest concentrations of quercetin-3, ellagic, caffeic, siringic, p-cumaric, naringine, and catechin, (c) sugarcane bagasse released the highest concentration of chlorogenic, vanillic, ferulic, and trans-cinamic acid. Jaboticaba peels and grape pomace were the most significant sources of reducing sugars after alkaline chemical treatment (6.7 and 6.25 g L^{-1} , respectively). Enzymatic treatment with laccases applied to the biomasses resulting from alkaline treatment demonstrated that the removal of lignin was greater under buffered conditions (pH 5,0). The enzymatic saccharification of samples previously treated with laccases was generally more efficient in conditions with the highest activity of laccases (1 U mL^{-1}) and cellulases (10 U mL^{-1}). The jaboticaba peels and sugarcane bagasse treated in alkaline and enzymatic reaction (non-simultaneous process with laccases

and cellulases) showed the highest release of reducing sugars (12.44 and 12.41 g L⁻¹, respectively). In a simultaneous process of treatment of biomasses with laccases and cellulases, a negative effect on the release of reducing sugars was observed, especially in grape pomace and jaboticaba peel, which may be related to structural changes caused by laccases in the cellulose fraction. The chemical and biological treatments evaluated in this work show the potential of Brazilian agroindustry residues to obtain bioactive phenolic compounds (which can be directed to segments of the pharmaceutical, food and cosmetics industries) and sugars for fermentative processes. Enzymatic methods applied individually can contribute in a "green" way to the treatment and valorization of biomass.

Keywords: sustainability; phenolic compounds; reducing sugars; laccases; cellulases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DE TRATAMENTOS QUE PODEM SER APLICADOS PARA MODIFICAR E GERAR PRODUTOS A PARTIR DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS.	30
FIGURA 2. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS, PROCESSAMENTO, FERMENTAÇÃO E RESÍDUOS: O ATUAL PROCESSO DE BIOETANOL.	34
FIGURA 3. COMPOSTOS FENÓLICOS DA LIGNINA: FONTES ALTERNATIVAS, ESTRUTURA E APLICAÇÕES.	45
FIGURA 4. ESPECTROS MIR-ATR DAS AMOSTRAS SEM TRATAMENTO.	68
FIGURA 5. SCORES DE PC1 E PC2 DAS AMOSTRAS.	69
FIGURA 6. LOADINGS DE PC1 E PC2 DAS AMOSTRAS.	70
FIGURA 7. IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS MATRIZES SEM TRATAMENTO.	71
FIGURA 8. ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DO PROCESSO.	76
FIGURA 9. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UMA FRAÇÃO DE LIGNINA.	77
FIGURA 10. ESQUEMA UTILIZADO NA OBTENÇÃO DE FENÓLICOS.	78
FIGURA 11. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE ARROZ.	88
FIGURA 12. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA.	88
FIGURA 13. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE JABOTICABA.	89
FIGURA 14. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE UVA.	89
FIGURA 15. DENDROGRAMA PARA AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS OBTIDOS DAS AMOSTRAS LÍQUIDAS.	90
FIGURA 16. DISTRIBUIÇÃO ALEATÓRIA DOS DADOS E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS QUANTO AOS DADOS OBTIDOS VIA HPLC.	94
FIGURA 17. ANÁLISE DE LOADINGS DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL AO LONGO DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.	95

FIGURA 18. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE ARROZ.....	99
FIGURA 19. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A CASCA DE ARROZ.	100
FIGURA 20. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA.	100
FIGURA 21. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES AO BAGAÇO DE CANA.	101
FIGURA 22. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE JABOTICABA.	101
FIGURA 23. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A CASCA DE JABOTICABA.	102
FIGURA 24. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE UVA.....	102
FIGURA 25. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A BAGAÇO DE UVA.	103
FIGURA 26. IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS MATRIZES SEM TRATAMENTO (À ESQUERDA) E COM TRATAMENTO QUÍMICO (À DIREITA) PARA A CASCA DE ARROZ E BAGAÇO DE CANA.	104
FIGURA 27. IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS MATRIZES SEM TRATAMENTO (À ESQUERDA) E COM TRATAMENTO QUÍMICO (À DIREITA) PARA A CASCA DE JABOTICABA E BAGAÇO DE UVA.	105
FIGURA 28. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO A SER REALIZADO SOBRE AS MATRIZES PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS.....	111
FIGURA 29. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE ARROZ.....	129
FIGURA 30. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A CASCA DE ARROZ.	130
FIGURA 31. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA.	130
FIGURA 32. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A BAGAÇO DE CANA.....	131

FIGURA 33- ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE JABOTICABA.	131
FIGURA 34. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A CASCA DE JABOTICABA.	132
FIGURA 35. ESPECTRO DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE UVA.....	132
FIGURA 36. DENDROGRAMA OBTIDO DOS DADOS ESPECTRAIS REFERENTES A BAGAÇO DE UVA.	133
FIGURA 37. SCORES E COMPONENTES PRINCIPAIS REFERENTE AOS DADOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE HPLC.....	136
FIGURA 38. ANÁLISE DE <i>LOADINGS</i> DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL AO LONGO DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.....	137
FIGURA 39. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE ARROZ.....	140
FIGURA 40. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA.	140
FIGURA 41. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DA CASCA DE JABOTICABA.	141
FIGURA 42. ESPECTRO DA FRAÇÃO SÓLIDA OBTIDA AO LONGO DO PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE UVA.....	141
FIGURA 43. SCORES E COMPONENTES PRINCIPAIS REFERENTE AOS DADOS OBTIDOS PELA ANÁLISE MIR-ATR.	143
FIGURA 44. ANÁLISE DE <i>LOADINGS</i> DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL AO LONGO DAS VARIÁVEIS ANALISADAS (COMPRIMENTO DE ONDA EM CM^{-1}).	144
FIGURA 45. IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS MATRIZES APÓS TRATAMENTO QUÍMICO (À ESQUERDA) E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO (À DIREITA) PARA A CASCA DE ARROZ E BAGAÇO DE CANA.....	145
FIGURA 46. IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS MATRIZES APÓS TRATAMENTO QUÍMICO (À ESQUERDA) E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO (À DIREITA) PARA A CASCA DE JABOTICABA E BAGAÇO DE UVA.....	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NO RENDIMENTO DA SACARIFICAÇÃO DE VÁRIAS MATRIZES VEGETAIS.	35
TABELA 2. COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL PRINCIPAL DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS QUE PODERIAM SER USADOS PARA PRODUIR ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (SGE).....	38
TABELA 3. PATENTES REGISTRADAS PARA O USO DE MATRIZES LIGNOCELULÓSICAS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ESPECÍFICOS.	41
TABELA 4. APLICAÇÕES COMERCIAIS DE SUBPRODUTOS DE RESÍDUOS DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	43
TABELA 5. ESTUDOS QUE RELATAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO FERÚLICO (FA) POR MEIO DE ROTA BIOLÓGICA.	46
TABELA 6. CARACTERÍSTICAS DOS PICOS DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA ANALISADOS POR ESPECTROSCOPIA (MIR-ATR).	63
TABELA 7. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO AOS TEORES DE UMIDADE, CINZAS, LIGNINA E CARBOIDRATOS.....	66
TABELA 8. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DO PERCENTUAL DE LIGNINA.	68
TABELA 9. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM mg DE ÁCIDO GÁLICO EQUIVALENTES POR GRAMA EM BASE SECA (mg EAG g ⁻¹ BS).....	86
TABELA 10. AÇÚCARES REDUTORES (g L ⁻¹) OBTIDOS APÓS OS TRATAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS.....	87
TABELA 11. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS (mg L ⁻¹) PRESENTES NAS FRAÇÕES RESULTANTES DAS REAÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS, OBTIDA PELA ANÁLISE UTILIZANDO HPLC.....	92
TABELA 12. MASSA PERDIDA (GRAMAS A CADA 100 GRAMAS DE AMOSTRA) AO LONGO DO PROCESSAMENTO DAS MATRIZES (MÉTODO GRAVIMÉTRICO).....	96

TABELA 13. PERCENTUAL DE LIGNINA (GRAMAS DE LIGNINA PARA CADA 100 GRAMAS DE AMOSTRA) PRESENTE NAS AMOSTRAS SÓLIDAS AO LONGO DO PROCESSAMENTO.	97
TABELA 14. DADOS OBTIDOS APÓS O TRATAMENTO DAS MATRIZES UTILIZANDO LACASE COMERCIAL EM CONCENTRAÇÕES DIFERENTES AVALIANDO A GERAÇÃO DOS PRODUTOS NAS FRAÇÕES LÍQUIDAS (DNS E CFT) E SÓLIDAS (LIGNINA E MASSA RECUPERADA).	121
TABELA 15. DADOS OBTIDOS APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM AJUSTE DE pH 5,0 UTILIZANDO HCL 1M.....	123
TABELA 16. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DAS BIOMASSAS COM LACASES EM MEIO TAMPONADO (TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 50 mM pH 5,0) E COM CORREÇÃO DE PH.	124
TABELA 17. REDUÇÃO DO PERCENTUAL DE LIGNINA DAS AMOSTRAS TRATADAS COM LACASE EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH....	125
TABELA 18. RESULTADOS OBTIDOS POR USO DE LACASE, SEGUIDO DA REAÇÃO DE CELULASE.....	126
TABELA 19. USO SIMULTÂNEO DE LACASE E CELULASE COMERCIAL, UTILIZANDO AS MELHORES CONDIÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ANTERIORES.....	127
TABELA 20. CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS (mg L ⁻¹) OBTIDA PELA ANÁLISE UTILIZANDO HPLC.	135

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVOS.....	23
Objetivo geral	23
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	26
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.2. BIORREFINARIAS: PROCESSOS E COMBINAÇÕES DE PROCESSOS	28
1.3. FONTES DE BIOMASSA PARA BIORREFINARIA: PRODUÇÃO MUNDIAL DE CULTURAS E SEUS RESÍDUOS	31
1.4. PRODUTOS DE BIORREFINARIA DERIVADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	33
1.4.1. Etanol de segunda geração (SGE)	33
1.4.1.1. Aspectos técnicos, econômicos e ambientais da produção de bioetanol	37
1.4.2. Produtos adicionais de biorrefinarias	42
1.4.3. Compostos fenólicos da lignina	44
1.4.3.1. Ácido ferúlico	45
1.4.3.2. Ácido p-cumárico	47
1.4.3.3. Ácido glutâmico	47
1.4.3.4. Ácido láctico	48
1.4.4. Sílica	49
1.5. CONCLUSÃO PARCIAL	51
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	52
2.1. INTRODUÇÃO	53
2.1.1. Casca de arroz	54
2.1.2. Bagaço de cana	55
2.1.3. Casca de jaboticaba	56

2.1.4. Bagaço de uva.....	57
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.2.1. Matrizes experimentais.....	59
2.2.2. Caracterização das amostras	59
2.2.2.1. Composição.....	60
2.2.2.2. Análise espectrofotométrica de lignina em brometo de acetila	61
2.2.2.3. Espectroscopia (MIR-ATR).....	62
2.2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	62
2.2.3. Análises estatísticas	63
2.2.3.1. Teste de Tukey	63
2.2.3.2. Análise de componentes principais.....	64
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
2.3.1. Caracterização das matrizes	65
2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	72
CAPÍTULO 3: MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRAIS E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	73
3.1. INTRODUÇÃO	74
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
3.2.1. Esquema experimental	76
3.2.2. Obtenção de compostos fenólicos	77
3.2.3. Caracterização das frações sólidas e extratos	79
3.2.3.1. Fração líquida	79
3.2.3.2. Fração sólida	81
3.2.4. Análises estatísticas	83
3.2.4.1. Teste de Tukey	83
3.2.4.2. Análise de componentes principais.....	83
3.2.4.3. Análise hierárquica de clusters (Hierarchical Cluster Analysis - HCA)	84
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.3.1. Avaliação da fração líquida.....	85

3.3.2. Avaliação da fração sólida	96
3.3.2.1. Espectroscopia (MIR-ATR)	98
3.3.2.2. MEV	103
3.4. CONCLUSÃO PARCIAL	106
CAPÍTULO 4: BIOCONVERSÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÚCARES REDUTORES	108
4.1. INTRODUÇÃO	109
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
4.2.1. Obtenção de açúcares fermentescíveis.....	111
4.2.2. Tratamentos enzimáticos.....	112
4.2.2.1. Preparo das matrizes tratadas.....	112
4.2.2.2. Determinação das atividades enzimáticas.....	113
4.2.2.3. Reação enzimática I	113
4.2.2.4. Reação enzimática II	114
4.2.3. Caracterização das frações sólidas e líquidas.....	114
4.2.3.1. Fração líquida	114
4.2.3.2. Fração sólida	117
4.2.4. Análises estatísticas	118
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	121
4.3.1. Preparo das matrizes e avaliação da atividade enzimática	121
4.3.2. Definição da reação enzimática I e II.....	125
4.3.3. Avaliação da fração líquida.....	128
4.3.4. Avaliação da fração sólida	138
4.4. CONCLUSÃO PARCIAL	147
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
REFERÊNCIAS.....	151
APÊNDICE 1: Curva padrão de lignina (método de brometo de acetila)	181
APÊNDICE 2: Curva padrão de açúcares redutores	182
APÊNDICE 3: Curva padrão para a análise de compostos fenólicos totais.....	183

INTRODUÇÃO GERAL

Com o avanço das mudanças climáticas associada as buscas por tecnologias e processamentos sustentáveis, o sistema de biorrefinaria vem sendo o foco de inúmeros estudos ante o uso de resíduos gerados nas indústrias tradicionais. Tais estudos evidenciam a busca por processos sustentáveis, considerados sistemas “verdes”, na obtenção de inúmeros produtos como bioetanol, bicomponentes e biosensores (BRENELLI *et al.*, 2018; HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

Diante da crescente busca por produtos de origem naturais, a indústria alimentícia (em grande parte) não consegue destinar os resíduos do seu processamento de maneira ideal, descartando componentes ricos em lignocelulose, uma vez que existem pouco aproveitamento para tais resíduos, exceto a produção de bio-carvões para uso em caldeiras no próprio ambiente industrial (KUNH *et. al.*, 2021; LIMA; BIGNER; WRIGHT, 2017; VAN ERVEN *et. al.*, 2019).

Considerando o atual sistema produtivo brasileiro, dependente de produtos agropecuários, estima-se que em média 35% da matriz obtida, para produção e modificação destes produtos, são gerados como resíduos e descartados, obtendo assim uma fonte de interesse para sistemas de biorrefinaria (ALOKIKA *et. al.*, 2021; KUREK *et. al.*, 2021; STHEL *et. al.*, 2019; VAN ERVEN *et. al.*, 2019).

As matrizes que possuem destaque quanto a geração de resíduos da indústria de alimentos são: a cana de açúcar, a soja e a casca de arroz. Tais matrizes são responsáveis por quase 62% dos resíduos gerados no Brasil (BRAR *et. al.*, 2022; YAO *et. al.*, 2020). Outras fontes como cascas de frutas e subprodutos oriundos de indústrias de sucos, geleias e vinhos vem apresentando um aumento dos índices da geração residual (MUNHOZ; MORABITO, 2014; TORRES-GARCIA; BRACHI, 2020).

Com isso sistemas de biorrefinarias se tornam ideais quanto a seu potencial inovador no uso de biomassa lignocelulósica para a conversão em produtos como o bioetanol, açúcares fermentescíveis e compostos fenólicos, contribuindo na redução de materiais residuais e aumentando a rentabilidade industrial na cooperação econômica de processos subjacentes (CHANDEL *et. al.*, 2022; KURNIAWATI; NICELL, 2008; RIYAP *et. al.*, 2019; SUN *et. al.*, 2021)

Diante de tais evidências, alguns estudos conseguiram extrair da fração de lignina, alguns compostos como ácido ferúlico e o ácido p-cumárico. Tais compostos são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, por auxiliar na renovação e cicatrização celular, porém possuem alto custo produtivo. Além de tais fenólicos, outros estruturais podem ser obtidos, como a sílica. Tal composto pode ser obtido de cascas e utilizado como agente adsorvente e controlador de umidade na armazenagem e preservação de produtos, como medicamentos, embalagens e alimentos, sendo aprovado seu uso em sachê ou diretamente em alimentos, por órgãos como o FDA (*Food and Drug Administration*) e a FAO (*Food and Agriculture Organization* - ONU) (FERRI *et. al.*, 2020; LIBREA *et. al.*, 2019; SEKIFUJI; VAN CHIEU; TATEDA, 2019; TAO *et. al.*, 2019).

Diante da possibilidade de associar a produção de etanol de segunda geração (principal foco industrial de biocombustíveis atualmente) com o uso de seus rejeitos processuais fermentativos para produção de compostos de interesse pela indústria, inúmeras fontes residuais vêm sendo pesquisadas, como a casca de uva, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, madeira residual proveniente de construções de edifícios, casca de banana, entre outros. Em todos os casos foram detectados a presença de interferentes que, por sua vez, reduzem a produtividade processual significativamente, que é o caso dos fenólicos que atuam sobre os microrganismos com potencial produtivo de etanol, dificultando sua rota metabólica e até mesmo ocasionando a morte de tais organismos (BOBOESCU *et. al.*, 2018; DZIADAS; JELENÍ, 2016; TAGHIZADEH-ALISARAEI *et. al.*, 2017).

Com isso o uso de fontes alternativas, sem co-geração de resíduos, se faz necessária a redução de interferentes como fenólicos. Tais interferentes pode ser extraídos por combinação de tratamentos, sejam físicos, químicos ou biológicos, como o uso de enzimas ou combinação destas, produzindo assim a menor quantidade de subprodutos reacionais para a produção de álcool, produzindo, em associação a este, produtos de amplo interesse pela indústria de fármacos e alimentícia, e.g., ácido ferúlico, o ácido p-cumárico e a sílica com alto grau de pureza (GOMEZ; PARK, 1985; MANZANO-AGUGLIARO *et. al.*, 2013; ROSA, 2015; SUPERBIA; PAULA, 2011).

Deste modo o objetivo deste trabalho foi obter um sistema cooperado de tratamentos de modo a viabilizar a implementação de uma biorrefinaria utilizando matrizes com características distintas, e produzir bioprodutos de elevado interesse

comercial, garantindo alta rentabilidade e aplicabilidade em seus estágios sugerindo avanços significativos na bioeconomia industrial.

JUSTIFICATIVA

Os sistemas de biorrefinarias estudados não abordam o uso de matrizes diferentes entre si diante tratamentos semelhantes, sejam químicos, físicos, biológicos ou combinação destes. Com isso, desencadeia a possibilidade do uso de matrizes com características distintas na obtenção de produtos de alto valor agregado, utilizando uma abordagem global, sendo uma excepcionalidade dentre os estudos realizados. Tal evidência remove a limitação da disponibilidade de recursos únicos utilizados em um projeto, mas sim a diversificação deste para inúmeras possibilidades de resíduos a serem manipulados. Tal diversificação é viabilizada na aquisição de produtos que foram removidos da complexa matriz lignocelulósica, com tratamentos específicos para obtenção de compostos únicos à matriz utilizada.

Com tal flexibilização, se estima que a obtenção de compostos bioativos e de açúcares fermentescíveis em metodologias brandas e de tecnologia “verde” é a principal busca industrial justaposta a necessidade primária quanto à busca do bioetanol (com o uso dos açúcares em etapas posteriores estudadas e otimizadas). Em suma, o aumento da rentabilidade industrial e a multiplicidade da aplicação em matrizes distintas para a obtenção de produtos distintos em um mesmo processo faz com que esse trabalho seja singular e altamente vantajoso, quando avaliada a economia circular do uso de resíduos provenientes de indústrias alimentícias.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar quatro resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, bagaço de uva, casca de arroz e casca de jaboticaba) no contexto de biorrefinaria, buscando um processo global sustentável na obtenção de produtos de alto valor agregado, como açúcares redutores e compostos fenólicos.

Objetivos específicos

CAPÍTULO 1: Revisão da Literatura

- Descrever aspectos fundamentais relacionados à escolha adequada de biomassas, principalmente da indústria de alimentos, para processos de biorrefinaria, incluindo sua disponibilidade local e global, e seu potencial para produzir materiais valiosos, como compostos fenólicos e açúcares fermentescíveis;
- Avaliar os tratamentos realizados em sistemas de biorrefinaria e os principais resultados relatados em estudos científicos de viabilidade e aplicabilidade em biomassas de diversas características.
- Apresentar uma visão sobre a viabilidade e possível rentabilidade dos processos de biorrefinaria em relação ao custo de produtos comerciais obtidos de fontes tradicionais já disponíveis no mercado.

CAPÍTULO 2: Avaliação físico-química e estrutural dos resíduos agroindustriais

- Avaliar a composição do bagaço de cana de açúcar, bagaço de uva, casca de arroz e casca de jaboticaba (umidade, cinzas, extrativos, lignina, celulose e hemicelulose);
- Caracterizar os principais grupamentos funcionais das amostras através da técnica de MIR-ATR e avaliar as características morfológicas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Realizar uma análise multivariada dos dados através da análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA).

CAPÍTULO 3: Modificação química dos resíduos agroindustriais e caracterização dos metabólitos secundários

- Realizar tratamentos físicos e químicos em etapas seriadas nas amostras de bagaço de cana de açúcar, bagaço de uva, casca de arroz e casca de jaboticaba, a fim de se obter uma fração líquida rica em fenólicos e açúcares;
- Caracterizar as frações líquidas em relação a concentração de compostos fenólicos totais e açúcares redutores;
- Avaliar os espectros de infravermelho das frações líquidas obtidas por MIR-ATR;
- Caracterizar as frações líquidas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao UV-Vis;
- Avaliar a fração sólida das amostras após os tratamentos por técnicas espectrofotométricas, MIR-ATR e MEV.

CAPÍTULO 4: Bioconversão dos resíduos agroindustriais e avaliação dos compostos fenólicos e açúcares redutores

- Tratar enzimaticamente com lacase e celulase as amostras da fase sólida de bagaço de cana de açúcar, bagaço de uva, casca de arroz e casca de jaboticaba que foram submetidas ao tratamento químico;
- Avaliar os compostos fenólicos totais, açúcares redutores das amostras tratadas enzimaticamente (métodos espectrofotométricos), os compostos fenólicos individuais (cromatografia líquida de alta eficiência) e MIR-ATR da fração líquida obtida;
- Avaliar a concentração de lignina, perda de massa das amostras ao longo do tratamento, MIR-ATR e MEV da fração sólida resultante do tratamento enzimático;
- Realizar uma análise multivariada dos dados através da análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA).

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1.1. INTRODUÇÃO

O conceito de biorrefinaria envolve a modificação de matrizes biológicas de várias fontes para gerar produtos de interesse comercial, incluindo produtos químicos, combustíveis e outros materiais valiosos. Nos processos de biorrefinaria, é possível usar um conjunto de tratamentos, sejam químicos, físicos ou biológicos, e uma ampla variedade de biomassas, juntamente com resíduos agroindustriais (KHAN *et. al.*, 2020; LI *et. al.*, 2020a; MATEI *et. al.*, 2019; SANTOS *et. al.*, 2020; UCHÔA *et. al.*, 2021).

Estudos indicam que o uso de ácidos, como o sulfúrico e o clorídrico, que são capazes de modificar a estrutura lignocelulósica das biomassas e liberarem produtos como o ácido ferúlico, a vanilina, o ácido p-cumárico e outros constituintes estruturais, como a sílica (ASKARULY *et. al.*, 2020; FERRI *et. al.*, 2020; SHARMA *et. al.*, 2020a; ZHAO *et. al.*, 2020). Outras técnicas que aplicam hidróxido de sódio e carbonato de cálcio podem modificar estruturas complexas, gerando os mesmos produtos (DOMINGOS *et. al.*, 2020; KHALEGHIAN; MOLAVERDI; KARIMI, 2017).

O uso de métodos biológicos, enzimáticos (lacase, ferulol esterase e celulase) ou microbiológicos pode resultar em uma alta taxa de conversão de substrato (biomassa) em produtos (BAKER *et. al.*, 2022; MATEI *et. al.*, 2020; ZHAO *et. al.*, 2020). Os tratamentos biológicos geralmente são inovadores e permitem a aplicação de uma baixa concentração de intermediadores químicos nos processos (MACHADO *et. al.*, 2019; MARTILLANES *et. al.*, 2021). No entanto, sua eficácia depende muito da escolha adequada da matriz e da enzima/microrganismo, o que, em última análise, afeta as condições do processo (tempo, temperatura, pH, custo, rendimento e assim por diante) (MATEI *et. al.*, 2020).

A possibilidade de usar resíduos ou subprodutos agroindustriais em processos de biorrefinaria é econômica e ambientalmente significativos (TSIPIRAS *et. al.*, 2022). Biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar e a casca de arroz são amplamente investigadas para a produção de compostos fenólicos e açúcares fermentáveis (AGUILAR *et. al.*, 2002; WOOD *et. al.*, 2016). No entanto, outras fontes, como casca de uva, bagaço de laranja, banana e tomate, tornaram-se substratos potenciais para

a geração de compostos fenólicos com atividade antioxidante e antimicrobiana, bem como para a produção de açúcares fermentescíveis e biodiesel (MATEI *et. al.*, 2020; MORENO *et. al.*, 2021; TSIPIRAS *et. al.*, 2022; UCHÔA *et. al.*, 2021).

Alguns estudos publicados recentemente descrevem a relevância técnico-científica dos sistemas de biorrefinaria com diferentes biomassas, apontando os prós e os contras de sua implementação. Jin *et. al.* (2021) relatou a viabilidade de usar bagaço de uva para produzir polifenóis e bio-carvão em um processo de biorrefinaria. Ubando *et. al.* (2020) demonstrou o impacto socioeconômico das biorrefinarias na no conceito de economia circular, demonstrando que os resíduos que são um problema para a sociedade podem se tornar uma solução para o setor de biocomponentes. Caldeira *et. al.* (2020) explicitou a necessidade de sistemas clássicos de segurança em relação aos processos de biorrefinaria, com foco na segurança, nos impactos econômicos e ambientais e na avaliação dos recursos alimentares em relação aos subprodutos que podem ser gerados.

Com base nos destaques apresentados até agora, os tratamentos, a composição e a disponibilidade das biomassas usadas em um sistema de biorrefinaria definem sua viabilidade e exigem avaliações específicas e globais. Assim, esta revisão descreve os aspectos fundamentais relacionados à escolha adequada de biomassas, principalmente da indústria alimentícia, para processos de biorrefinaria, incluindo sua disponibilidade local e global e seu potencial para produzir materiais de alto valor comercial, como compostos fenólicos, açúcares fermentáveis e produtos disponíveis na estrutura da matriz. Além disso, a revisão discute os tratamentos realizados em sistemas de biorrefinaria e os principais resultados relatados em estudos científicos sobre a viabilidade e a aplicabilidade em biomassas de várias características. Por fim, é apresentada uma visão sobre a viabilidade e a possível lucratividade dos processos de biorrefinaria em relação ao custo de produtos comerciais obtidos de fontes tradicionais que estão disponíveis no mercado, abordando assim todos os aspectos básicos na possibilidade de implantação de uma biorrefinaria.

1.2. BIORREFINARIAS: PROCESSOS E COMBINAÇÕES DE PROCESSOS

A biorrefinaria pode ser definida como um meio sustentável de gerar produtos com alto valor agregado a partir de biomassas por meio de diferentes técnicas. Considerando que as emissões de gases de efeito estufa estão aumentando, os combustíveis fósseis estão se esgotando e a demanda de energia está crescendo, por esses motivos, as biomassas aparecem como uma fonte de energia atraente, viável e renovável. Além disso, a biorrefinaria envolve o conceito de bioeconomia circular, abordando o setor industrial em aspectos econômicos, ambientais e sociais (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020), incluindo a reutilização, a reciclagem e a remanufatura de biomateriais em ciclos industriais (CORRADO; SALA, 2018). Por meio de processos de biorrefinaria, é possível reduzir a produção de resíduos, permitindo o uso quase completo de uma biomassa para obter compostos/produtos de interesse econômico (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019).

As biorrefinarias podem ser montadas em uma, duas ou três fases distintas (dependendo da escolha das biomassas, dos processos e dos produtos desejados). A Fase I usa um substrato e gera um único produto, por exemplo, a produção de etanol usando biomassa de cana-de-açúcar (JIN *et. al.*, 2018; SHERPA *et. al.*, 2022). As consideradas como fase II consistem no uso de um substrato para obter vários produtos, como a produção de lactoferrina, ácido láctico, proteínas isoladas, probióticos e biogás a partir do soro de leite (BANERJEE *et. al.*, 2021; TEDESCO *et. al.*, 2021). As biorrefinarias da Fase III podem ser adaptadas ao uso de vários substratos para obter os mesmos produtos sem a geração de resíduos (BANERJEE *et. al.*, 2021).

Tratamentos físicos, químicos e biológicos (Figura 1) podem ser aplicados individualmente ou combinados para modificar a estrutura/morfologia de uma biomassa lignocelulósica, remover interferentes (NAYAK; BHUSHAN, 2019), e gerar diferentes produtos (LAU; HARBOURNE; ORUÑA-CONCHA, 2020; LIBREA *et. al.*, 2019; ZOU; YANG, 2019). O uso de tratamentos sequenciais visa aumentar a lucratividade do processo, reduzir a perda de potenciais produtos, descartados anteriormente, afim de aumentar a produtividade (CLAES *et. al.*, 2020; LADAKIS *et. al.*, 2022; NAYAK; BHUSHAN, 2019). Portanto, a biorrefinaria tem se mostrado uma alternativa interessante para o uso completo de subprodutos industriais.

Figura 1. Representação de tratamentos que podem ser aplicados para modificar e gerar produtos a partir de biomassas lignocelulósicas.



A conversão de resíduos e subprodutos lignocelulósicos em produtos de interesse comercial por meio de processos combinados (principalmente químicos e biológicos) tornou-se o objetivo de muitos estudos recentes. Din *et. al.* (2021) relatou a aplicação de um pré-tratamento alcalino com hidrólise enzimática subsequente (utilizando Accelerase[®] (endoglucanase, β -glucosidase and β -D-glucopyranoside)) em cascas de coco maduras e jovens, o que resultou na redução de 20,15% da lignina do coco maduro e 31,17% do coco jovem. O uso da mistura enzimática (10% m/m por 24 horas de reação) aumentou em 71,23% a eficiência do processo de hidrólise em cascas maduras e em 89,49% a eficiência do processo de hidrólise em cascas jovens (DIN *et. al.*, 2021).

Em um estudo realizado por Khaire *et. al.* (2021), a biomassa de cana-de-açúcar (cana-de-açúcar com folhas e brotos foliculares) foi pré-tratada com ácido bórico (1% p/v) e NaOH (pH 13), seguida de sacarificação usando enzimas hidrolíticas recombinantes de *Clostridium* e *Hungateiclostridium thermocellum* (endo-1,4- β -glucanase [213,2 Ug⁻¹]; cellobiohidrolase [272,5 U g⁻¹] e β -glucosidase [299,8 U g⁻¹])

por um período de 49,2 horas. Isso resultou em 265 mg de açúcar redutor por grama de substrato, sendo 214 mg de açúcares fermentáveis que foram posteriormente modificados por *Saccharomyces cerevisiae*, gerando 0,19 g de bioetanol por g de glicose (CHANDRAKANT KHAIRE; SURYAKANT MOHOLKAR; GOYAL, 2021).

O uso de enzimas e microrganismos (geneticamente modificados ou não) em processos de biorrefinaria é muito atraente em relação aos aspectos ambientais (redução de resíduos e subprodutos tóxicos) e à produtividade. Del Rio *et. al.* (2019) usou casca de arroz como substrato na sacarificação simultânea (usando o coquetel enzimático CTec 2) e na co-fermentação, alcançando uma produção de 91,9 g L⁻¹ de etanol. Os resíduos de alimentos domésticos (ricos em lipídios, carboidratos e fibras) foram usados em uma reação combinada com *Clostridium* sp. e *Lactobacillus* sp. resultando em 11 gramas de voláteis totais por dia para cada litro de resíduo, sendo convertidos em 0,38 g de ácido graxo volátil por grama de voláteis totais. Em condições de baixos valores de pH, levando em conta os ácidos graxos voláteis, o processo gerou 60% de ácido butírico e 20% de ácido capróico (STRAZZERA *et. al.*, 2021). Baptista *et. al.* (2023) projetou um sistema de biorrefinaria para produzir um biocatalisador, etanol e xilitol usando resíduos de vinícolas (resíduos de mosto de uva, brotos de videira e borras de vinho) e cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Em processos simultâneos de sacarificação e fermentação, os autores relataram uma produção de 37 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ de xilitol e etanol, respectivamente (BAPTISTA *et. al.*, 2023).

1.3. FONTES DE BIOMASSA PARA BIORREFINARIA: PRODUÇÃO MUNDIAL DE CULTURAS E SEUS RESÍDUOS

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima que cerca de 13,3% de toda a produção de alimentos se transformará em resíduos por meio de processamento ou armazenamento. Estima-se que a quantidade global de resíduos de alimentos se aproximará de 1,3 bilhão de toneladas por ano. O desperdício *per capita* atual é estimado em 121 kg de alimentos por ano. Essa alta quantidade de desperdício de alimentos está relacionada principalmente à exigência de produtos frescos por parte dos consumidores em alguns mercados e ao

gerenciamento e processamento pós-colheita precários em nações emergentes. Alimentos como cereais, frutas e vegetais são os mais desperdiçados durante o processamento industrial. Em 2021, na África do Sul, estimava-se que cerca de 20,5% das frutas e vegetais eram desperdiçados em seu processamento industrial (FAO, 2011).

Nas biorrefinarias, esses resíduos e subprodutos podem ter sua estrutura modificada para gerar polissacarídeos, açúcares, fibras, proteínas, lipídios, pectinas e fitoquímicos, e fornecer ao consumidor final produtos de alta qualidade com um custo de produção menor (NAYAK; BHUSHAN, 2019). Os resíduos de fontes como casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e casca de uva podem ser usados para a produção de enzimas (MATEI *et. al.*, 2020).

Os pesquisadores têm usado resíduos do processamento industrial de frutas, vegetais ou uma mistura deles em diversas aplicações. Banerjee *et. al.* (2021) produziu, para cada tonelada de casca de abacaxi, 1 kg de bromelaína (protease com propriedades terapêuticas), 24 kg de xilo-oligossacarídeo, 88 kg de glicose e 66 kg de hemicelulose. Outro estudo demonstrou que o uso de resíduos de um mix de frutas (semente, casca e partes impróprias para consumo), como abacaxi, maçã, banana, manga e melão, pode ser uma alternativa viável para a produção de bioetanol (atingindo a produtividade de 21.63 g L^{-1}) (ZANIVAN *et. al.*, 2021).

As sementes e a pele dos tomates-cereja foram aplicadas para a extração de proteínas, fibras dietéticas e óleo (BAKER *et. al.*, 2022). Em outro estudo, os resíduos do cultivo de tomate (Almeria-Espanha) foram usados como substrato em um processo catalítico extrusivo, gerando 39,4% de conversão em açúcares (em termos do suco gerado pelo processo extrusivo) (MORENO *et. al.*, 2021).

Um grande número de resíduos é produzido durante o manuseio, a pós-colheita e os pré-tratamentos industriais dos cereais (FAO, 2011). Culturas como a soja são amplamente utilizadas para a produção de óleo; no entanto, elas geram resíduos com alta carga de proteínas, lipídios, carboidratos e compostos bioativos. Esses compostos bioativos incluem os ácidos fenólicos (como o clorogênico e o ferúlico) e os flavonoides (como a rutina e a genisteína), moléculas com alto potencial antioxidante e digestibilidade, que podem ser incorporadas a alimentos funcionais (TANGKHAWANIT; SIRIAMORNPNUN, 2021). Outros produtos que podem ser obtidos de plantações são o carvão ativado com estruturas absorvidos/adsorvidos da casca

(BAIG; GUL, 2021), etanol após hidrólise enzimática do farelo de trigo (DOMINGOS *et. al.*, 2020) e bioprodutos pela extração de lignina da palha de trigo (LOU; ZHANG, 2022). Além disso, as culturas geradoras de resíduos, como o arroz (MARTILLANES *et. al.*, 2021), sorgo (PUNIA *et. al.*, 2021) e aveia (MARTÍN-DIANA *et. al.*, 2021), também demonstraram grande potencial na geração de coprodutos, como compostos fenólicos e açúcares (MARTÍN-DIANA *et. al.*, 2021).

Os ciclos de colheita e processamento de determinadas culturas podem se tornar um obstáculo para o uso dessas culturas individualmente em biorrefinarias. Portanto, diferentes culturas podem ser misturadas antes da aplicação (CLAES *et. al.*, 2020), como resíduos de frutas e vegetais, ricos em açúcares e proteínas, para a co-geração de ração animal [69] ou sequenciados com abatedouros, para gerar metano em uma eficiente co-digestão anaeróbica (LADAKIS *et. al.*, 2022). Outro estudo demonstra que o óleo de avicultura combinado com lodo de soja em um processo de transesterificação gera 99% de ésteres de ácidos graxos com 5% de lodo de soja, evidenciando seu uso na produção de biodiesel (KUNH *et. al.*, 2021).

1.4. PRODUTOS DE BIORREFINARIA DERIVADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

1.4.1. Etanol de segunda geração (SGE)

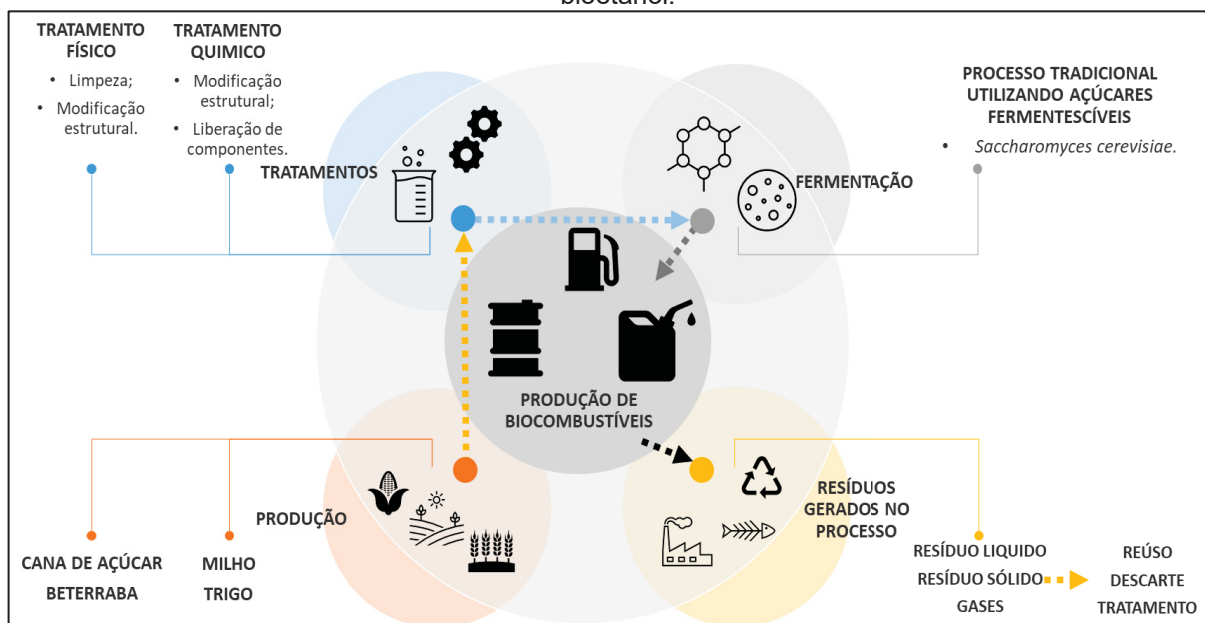
O etanol é um álcool com muitas aplicações em vários contextos, principalmente como combustível, e agente antimicrobiano em diferentes produtos e formulações. Pode ser obtido por fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução do acetaldeído (CLAXTON, 2015). Entre esses métodos, o processo de fermentação é o mais usado para a produção de etanol, pois os açúcares estão amplamente disponíveis e o custo é menor do que o das rotas químicas (VAZ *et. al.*, 2019).

Em um processo tradicional de produção de etanol (etanol de primeira geração, Figura 2), variáveis como pH, tempo e temperatura são ajustadas para a fermentação, que é seguida por etapas de purificação e destilação do produto desejado (BORDONAL *et. al.*, 2018).

Devido aos incentivos financeiros e ao desenvolvimento de tecnologias de fermentação em troca de benefícios para as usinas de cana-de-açúcar, o etanol passou a ser amplamente fabricado no Brasil e um dos combustíveis mais utilizados (SILVA *et. al.*, 2018). A produção de etanol também foi expandida por meio de incentivos governamentais europeus, americanos e asiáticos para atender à crescente demanda global e ao apelo ambiental (LALUCE *et. al.*, 2019; PANDIYAN *et. al.*, 2019; SAINI; AGGARWAL; YADAV, 2018). Além disso, a mistura de etanol à gasolina aumenta significativamente o volume de combustível sem alterar significativamente seu rendimento em relação à massa inicial do produto, com uma variação de 2% no consumo quando se adiciona 22% de etanol (v/v). Isso pode reduzir o impacto ambiental (efeito estufa) em cerca de 20% em termos de emissão de gases, como CO₂, óxidos nitrosos e aldeídos, causados pela queima de outros combustíveis (VANHOLME *et. al.*, 2019).

A ideia principal em um sistema de biorrefinaria de fase I envolve a produção de biocombustíveis usando fontes alternativas, como resíduos industriais e subprodutos. Essa alternativa resulta em um etanol de segunda geração (SGE) que está diretamente relacionado ao processo convencional de produção de etanol (BROWN *et. al.*, 2020; DE ANDRADE JUNIOR *et. al.*, 2019).

Figura 2. Principais matérias-primas, processamento, fermentação e resíduos: o atual processo de bioetanol.



Assim, várias fontes alternativas foram estudadas para reduzir os custos e acelerar a produção de glicose (Tabela 1). Com os avanços nas pesquisas sobre biorrefinarias de fase I, as biorrefinarias de fase II surgiram como uma opção viável para gerar vários produtos a partir do mesmo substrato (SEBASTIÁN-NICOLÁS *et al.*, 2020). Consequentemente, as matrizes não convencionais se tornaram objeto de estudo para a obtenção de biocombustíveis (inclusive etanol). Resíduos de milho (YU *et al.*, 2019), cana de açúcar (CARVALHO *et al.*, 2020), trigo e sorgo (HERMOSILLA; SCHALCHLI; DIEZ, 2020; ZHANG *et al.*, 2019) e amido processado (VAZ *et al.*, 2019) foram citados como fontes promissoras para a produção de etanol de segunda geração.

Tabela 1. Efeito de diferentes tratamentos no rendimento da sacarificação de várias matrizes vegetais.

Matriz	Tratamento	Resultados obtidos	Referência
Casca de mandioca	Sacarificação e fermentação simultâneas com controle do tempo de pré-hidrólise	Aumento da concentração de bioetanol	(ARUWAJOYE; SEWSYNKER-SUKAI; KANA, 2020)
Bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz	Pré-tratamento com extrato enzimático bruto rico em lacase	Melhoria na deslignificação e no rendimento de açúcares redutores após a sacarificação 10 vezes	(MATEI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Eucallyptus globulus</i>	Pré-tratamento com vapor e submetido à ação de lacases produzidas por <i>Marasmiellus palmovorus</i> VE111	Melhoria da sacarificação em 25% e 70% de remoção de compostos fenólicos livres	(SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pleioblastus amarus</i> (bambu)	Pré-tratamento hidrotérmico com temperaturas entre 160 e 200 °C	O controle da gravidade do pré-tratamento hidrotérmico pode melhorar a adsorção da proteína celulase na celulose e aumentar o rendimento da glicose	(YANG <i>et al.</i> , 2020a)

Continuação da Tabela 1

Matriz	Tratamento	Resultados obtidos	Referência
Saccharum munja e bagaço de cana	Tratamento químico e enzimático seguido de sacarificação das matrizes em questão	O pré-tratamento enzimático foi mais significativo para ambas as matrizes, resultando em uma remoção de 77% da lignina do meio, melhorando a sacarificação em ambos os casos e levando a uma maior produtividade de SGE	(BALA; SINGH, 2019)
Palha de arroz	Comparação da sacarificação da palha de arroz sem tratamento com aquela submetida a tratamento com vapor a 210 e 220 °C por 10 minutos e depois de submetida à celulose	A casca submetida ao tratamento a vapor a 210 °C por 10 minutos apresentou um rendimento maior em comparação com os outros casos	(WOOD <i>et. al.</i> , 2016)
Casca de arroz, bagaço de cana e casca de soja	Uso de um extrato enzimático bruto da bioreação de <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652	Resultou em uma maior significância em comparação com a produção de açúcares fermentáveis para a casca de arroz	(ASTOLFI <i>et. al.</i> , 2015)

Estima-se que 1.000 kg de bagaço de cana-de-açúcar podem resultar em 184,9 kg de etanol e 177,64 kg de dióxido de carbono em um processo que depende do pré-tratamento da biomassa usando NaOH, seguido de sacarificação (β -glucosidase e Celluclast®) e fermentação (*S. cerevisiae* TISTR 5606); no entanto, aproximadamente 631,46 kg de resíduos sólidos (solubilizados ou não) podem ser produzidos durante todo o processo (PAULRAJ GUNDUPALLI *et. al.*, 2021).

Em um sistema projetado para fermentação e co-fermentação simultâneas (usando o coquetel enzimático CellicCTec) de resíduos da indústria de suco de laranja, foi possível produzir até 83 m³ de biogás e 25 L de etanol para cada 550 kg de resíduos (TSIPIRAS *et. al.*, 2022). O estudo também sugere um processo de biorrefinaria de fase II, descrevendo a sustentabilidade e a circularidade, incluindo a possível geração de resíduos.

Alguns estudos se concentraram no potencial de novos substratos/resíduos para a produção de bioetanol por meio da avaliação de sua composição estrutural (principalmente a fração celulósica). Casca de eucalipto (REINA *et. al.*, 2016), resíduos de madeira de construção (BOBOESCU *et. al.*, 2018), resíduos agrícolas, como palha de trigo e arroz (FERRI *et. al.*, 2020; INDRIANI *et. al.*, 2019), plantas aquáticas (KNOTHE; RAZON, 2017), e resíduos agroindustriais, como cascas de banana e uva (DZIADAS; JELEN, 2016; SILVA *et. al.*, 2018; SOUZA *et. al.*, 2019) são biomassas promissoras para a liberação de açúcares (referentes às frações celulósica e hemicelulósica) a partir da sacarificação e da produção de etanol (Tabela 2). O uso dessas biomassas alternativas está associado a pré-tratamentos específicos (principalmente para remover a fração de lignina ou soltar as fibras), como ácido, alcalino e ácido seguido de alcalino ou microbiológico, e sacarificação enzimática (celulases) com resultados promissores (ALVES *et. al.*, 2019; BECHARA *et. al.*, 2018; BOBOESCU *et. al.*, 2018; SOUZA *et. al.*, 2019; VAZ *et. al.*, 2019).

O conhecimento científico sobre a produção de SGE por diferentes processos e várias biomassas avançou substancialmente ao longo dos anos. No entanto, alguns aspectos relativos à eficiência, sustentabilidade e lucratividade da produção de SGE ainda precisam de atenção, como (1) a escolha adequada e a otimização dos pré-tratamentos (químicos, biológicos ou combinados) para reduzir os custos, o tempo e a geração de resíduos tóxicos (minimizar o impacto ambiental é fundamental para a produção de SGE); (2) a redução dos custos e do tempo para a sacarificação enzimática; (3) o aumento da escala do processo (da bancada para reatores piloto) (BROWN *et. al.*, 2020; VANHOLME *et. al.*, 2019). Além disso, a produção ou o refinamento concomitante de outras moléculas durante o pré-tratamento (como lignina, fenólicos da lignina, enzimas (quando biológicas)) poderia aumentar o portfólio de produtos para o setor e a viabilidade econômica do sistema de biorrefinaria (BRUNNHOFER *et. al.*, 2020).

1.4.1.1. Aspectos técnicos, econômicos e ambientais da produção de bioetanol

Em busca de combustível biodegradável com menor toxicidade, os governos implementaram novas políticas sociais. A Alemanha, os EUA e a Turquia concentram

Tabela 2. Composição estrutural principal dos resíduos agroindustriais que poderiam ser usados para produzir etanol de segunda geração (SGE).

Amostra	Celulose (% da fração mássica extraída)	Hemicelulose (% da fração mássica extraída)	Lignina (% da fração mássica extraída)	Fonte
Casca de soja	32.91	3.02	2.05	(DEBIAGI; FARIA-TISCHER; MALI, 2020)
Bagaço de uva	12.75	14.60	40.84	(TORRES-GARCIA; BRACHI, 2020)
Salgueiro chorão	49.00	17.30	19.80	(ZHONG <i>et. al.</i> , 2020)
Madeira de eucalipto	41.52	13.75	28.33	(SCHNEIDER <i>et. al.</i> , 2020)
Folhas de alfafa	33.20	23.90	9.40	(QU <i>et. al.</i> , 2020)
Casca de arroz fresca	18.50	28.00	15.90	(ABAIDE <i>et. al.</i> , 2019)
Casca de sorgo	37.12	27.05	6.29	(ALMEIDA <i>et. al.</i> , 2019)
Casca da vagem de cacau	3.30	20.90	29.50	(DAHUNSI <i>et. al.</i> , 2019)
Bagaço de cana-de-açúcar	40.47	35.24	23.69	(LALUCE <i>et. al.</i> , 2019)
Banana esmagada e seca	44.00	16.40	8.10	(SOUZA <i>et. al.</i> , 2019)
Farelo de trigo cru	31.10	34.30	16.30	(XIAO <i>et. al.</i> , 2019)
Palha de milho	41.05	31.39	6.34	(WANG <i>et. al.</i> , 2016)
Fibras de folha de abacaxi cru	64.48	20.89	4.24	(TANPICHAI; WITAYAKRAN; BOONMAHITTHISUD, 2019)
Aguapé	25.00	35.00	10.00	(BRONZATO <i>et. al.</i> , 2019)
Bagaço de sorgo doce	29.26	19.97	19.27	(LIMA; BIGNER; WRIGHT, 2017)
Bagaço de sorgo	36.96	-	19.66	(KOTAIAH NAIK <i>et. al.</i> , 2017)

a maioria dos estudos relacionados a bioetanol, beterraba e biomassa. Essas pesquisas estão diretamente relacionadas à aplicação de novas tecnologias para substituir os combustíveis fósseis (JIMÉNEZ-ISLAS *et. al.*, 2021). As diretrizes europeias descritas pela RED 2009/28/EC (RED II) exigem que, até 2030, países como a Croácia tenham 3,5% de seu uso de combustível proveniente de biocombustíveis derivados de matriz lignocelulósica e residual (ŠURIĆ *et. al.*, 2021).

Os maiores produtores de alimentos da América ocupam um lugar de destaque na produção e na implementação de políticas de biocombustíveis. No Brasil, foi identificado um aumento de 7,5% no bioetanol no ano de 2020, com uma perspectiva de aumento para 15% em 2023. Estudos também mostram uma maior eficiência na mistura de gasolina (63% v/v) e bioetanol (27% v/v). Os EUA, que detêm 54% da produção mundial de etanol, possuem bioetanol com custos de até 0,545 dólar por litro de gasolina equivalente, evidenciando que seu uso é mais atraente quando associado ao aspecto ambiental (SAJID; DA SILVA; DANIAL, 2021).

Analizamos também uma comparação dos impactos pré-pandemia e pandemia, onde foi detectada uma redução no uso de biocombustíveis. Com o aumento do preço dos combustíveis, foi notória a redução da carga de trabalho e a redução do consumo, além de uma redução quanto a geração de CO₂ (SHADIDI; NAJAFI, 2021).

Entre esses ramos industriais, há a promissora utilização futura da lignina nas indústrias termoplásticas por meio de seu uso como novo polímero, minimizando o consumo de recursos não renováveis para a fabricação de termoplásticos sintéticos (FONSECA; COSTA; CRUZ, 2020; HUANG *et. al.*, 2020). Esses estudos, quase em sua maioria patentes registradas, apresentam a integração de processos cujo produto principal ou secundário é o etanol (DICKSON; RYU; LIU, 2018; GALANOPOULOS *et. al.*, 2019). A biorrefinaria de uso completo do substrato pode ser usada para reduzir significativamente a produção de subprodutos do processo e para otimizar a obtenção de compostos que, ao serem purificados, possuem uso e valor de interesse comercial (FONSECA; COSTA; CRUZ, 2020; GALANOPOULOS *et. al.*, 2019).

Atualmente, os tratamentos que envolvem lignocelulose têm sido otimizados e justificados com a redução de custos, seja por modificações antes do processamento aplicado à matriz (FERNANDES *et. al.*, 2017; IDRIS *et. al.*, 2019) ou a purificação dos produtos (ALVES DE OLIVEIRA *et. al.*, 2020; ORIEZ; PEYDECASTAING; PONTALIER, 2020). Dos tratamentos utilizados, os químicos integrados aos físicos

são os mais usados (LALUCE *et. al.*, 2019). Entretanto, os processos biológicos têm demonstrado maior produtividade e custos reduzidos. Por outro lado, o uso de ácidos fortes requer neutralização para tratamento posterior, aumentando assim o volume total e tornando a purificação desses produtos mais complexa (ALVES DE OLIVEIRA *et. al.*, 2020; CALDEIRA *et. al.*, 2020; ORIEZ; PEYDECASTAING; PONTALIER, 2020). Essa busca por métodos biológicos segue os protocolos internacionais para reduzir a coprodução de produtos indesejados (CHANDRAKANT KHAIRE; SURYAKANT MOHOLKAR; GOYAL, 2021) e proporcionando uma expansão do uso de biorrefinarias, com custos significativamente menores (FONSECA; COSTA; CRUZ, 2020).

Devido aos altos custos de produção, várias patentes foram modificadas e otimizadas considerando o uso global do substrato, com o conceito de biorrefinaria de uso total (ABAIDE *et. al.*, 2019). Esses altos custos decorrem principalmente da purificação dos produtos obtidos, que geralmente usam técnicas como coluna para purificação, como a cromatografia (AGRAWAL *et. al.*, 2020) ou filtração (SANDES *et. al.*, 2021). Esses tratamentos exigem manutenção constante e o monitoramento contínuo dos produtos, pois qualquer variável pode afetar diretamente o produto de interesse (AGRAWAL *et. al.*, 2020; LANGE; MEYER, 2019; SANDES *et. al.*, 2021). Algumas patentes foram desenvolvidas em todo o mundo, mesmo com tratamentos primários e secundários complexos correlacionados a purificação. No entanto, ainda há uma geração de produtos de reação do processo (Tabela 3).

Nesse contexto, a simplificação de sistemas complexos torna-se uma solução óbvia para os problemas na implementação de biorrefinarias. Estudos mostram que a tecnologia avançada e o menor custo operacional foram obtidos com técnicas simples, mas com alta especificidade e produtividade (NOGUEIRA *et. al.*, 2020; SANTOS *et. al.*, 2020). Alguns tratamentos enzimáticos e biológicos são identificados como alternativas às biorrefinarias, com custos operacionais mais baixos e maior produtividade.

Os custos operacionais são variáveis dependentes do processo ao qual é submetido. No processo de obtenção do etanol de segunda geração, esses custos são diretamente dependentes da aquisição de equipamentos e de suas despesas operacionais (DICKSON; RYU; LIU, 2018).

Tabela 3. Patentes registradas para o uso de matrizes lignocelulósicas para a obtenção de compostos específicos.

Identificação de patente	Descrição	Referência
US20190276857A1	Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica usando sacarificação, processos de co-fermentação e tratamentos enzimáticos simultaneamente.	(THELEN; MARTIN; ROTH, 2019)
ES2687688T3	Modificação de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis com base em pré-tratamento hidrotérmico e fermentação de etanol em uma única etapa.	(LARSEN <i>et. al.</i> , 2018)
EP3757220A1	Biomassa lignocelulósica pré-tratada enzimaticamente para produzir pentoses e hexoses em um sistema de quatro etapas: consiste em combinar a enzima com o microrganismo a 30-37 °C (primeira etapa), depois de usar esse sistema a 45-55 °C (segunda etapa), depois a 35-38 °C (terceira etapa) e a última (quarta etapa) adicionando um microrganismo co-fermentador por um período de 6-8 horas para obter etanol na mesma temperatura anterior.	(SHARMA <i>et. al.</i> , 2020b)
USO08900369B2	Fracionamento da biomassa lignocelulósica usando uma baixa proporção de solvente/sólidos para separar compostos específicos, como lignina, hemicelulose e celulose, possibilitando a obtenção de açúcares fermentáveis diretos superiores a 100 gramas por litro de solução a um baixo custo de processamento. A fermentação do etanol é aplicada após esses tratamentos.	(ZHANG, 2014)
US009334545B2	A biomassa é vaporizada e, em seguida, vai para um reator que pressiona e separa a matriz em sólidos e líquidos. A parte sólida se converte em etanol por meio de um processo biológico, e a parte líquida permite a produção de ácidos, partes de lignina e outros compostos de alto valor comercial.	(MCDONALD; CARLSON; D. BRADFORD, 2016)

Alguns estudos mostram que a produção de etanol de segunda geração em uma escala de produção de 108,7 toneladas por hora tem um custo de aquisição de US\$ 143,5 milhões e um custo operacional de US\$ 2.598,00 por hora, usando bagaço de

cana-de-açúcar tratado química e biologicamente, que gera biogás, eletricidade e fertilizante concomitantemente (DOS SANTOS *et. al.*, 2016).

Outros estudos avaliaram o uso de enzimas específicas no sistema interno, com custos totais de produção enzimática de US\$ 0,55 por unidade de produção. 100×10^3 FPU (Filter paper unit – Unidades de papel filtro) e produtividade enzimática de 250 FPU L⁻¹ h⁻¹. (GERALDO *et. al.*, 2020). Assim, se integrarmos a produção de outros compostos de alto valor comercial, é possível reduzir o custo de produção e aumentar a produtividade por meio de processos biológicos associados ao aproveitamento integral da matriz lignocelulósica. No entanto, as políticas governamentais influenciam diretamente o uso desses combustíveis, contribuindo para a redução do impacto ambiental e aumentando a viabilidade tecnológica.

Assim, o uso de fontes residuais alternativas, como processos alimentares, por meio de um sistema de biorrefinaria de uso integral tem alta viabilidade econômica, ampla gama de produção de compostos bioativos, biocombustíveis e carvão (ORIEZ; PEYDECASTAING; PONTALIER, 2020; UCHÔA *et. al.*, 2021; YANG *et. al.*, 2020a).

1.4.2. Produtos adicionais de biorrefinarias

Os subprodutos da biorrefinaria de álcool foram reconhecidos por seu maior valor comercial e ampla aplicação nos setores químico, farmacêutico, cosmético e alimentício (CALDEIRA *et. al.*, 2020). Dos inúmeros subprodutos dos sistemas de biorrefinaria, o ácido ferúlico, o ácido glutâmico e o ácido láctico são os mais proeminentes por seu alto valor agregado comercial (Tabela 4).

Os avanços nos processos de biorrefinaria também tornaram a lignina um polímero em potencial de grande valor econômico, principalmente porque as características intrínsecas, como a presença de grupos aromáticos e hidroxila, a estrutura lipohidrofílica, a capacidade de reforço e a biodegradabilidade (GARLAPATI *et. al.*, 2020). A lignina tem uma elevada concentração fenólica e o potencial de fornecer compostos de amplo uso comercial, que variam de acordo com a fonte de biomassa lignocelulósica. Esses compostos podem ser usados nos setores farmacêutico, alimentício, de polímeros, de combustíveis e de produtos químicos de valor agregado (PAONE; TABANELLI; MAURIELLO, 2020).

A degradação ou remoção da lignina dos resíduos lignocelulósicos pode ocorrer por meio de enzimas ligninolíticas microbianas, como peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase), lacase, glucuronil esterase e outras. Portanto, o uso de fungos de podridão branca (amplamente conhecidos pela produção de peroxidases e lacases) ou de microrganismos com engenharia metabólica (*Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia eutropha*, e *Rhodococcus jostii*) o pré-tratamento de resíduos agroindustriais pode aumentar o rendimento da lignina em processos de biorrefinaria (SHIN *et. al.*, 2019).

Tabela 4. Aplicações comerciais de subprodutos de resíduos de etanol de segunda geração.

Composto	Aplicações	Referencias
Ácido ferúlico	Cosméticos, farmacêuticos e biomédicos.	(KUMAR; PRUTHI, 2014; SIGMA ALDRICH, 2021)
Ácido glutâmico	Indústrias alimentícias, médicas, farmacêuticas e de águas residuais.	(OGUNLEYE <i>et. al.</i> , 2015; SIGMA ALDRICH, 2021)
Ácido láctico	Produtos de limpeza; cosméticos; alimentos e bebidas; cuidados pessoais e farmacêuticos.	(RODRIGUES <i>et. al.</i> , 2016; SIGMA ALDRICH, 2021)
Polietileno glicol	Farmacêutico, adesivos, esmaltes cerâmicos, intermediários químicos (poliuretano hidrofílico), espumas, tintas, lubrificantes, desmoldante, plastificante e tratamento de madeira.	(DOW, 2021)
D-lisina	Componente de uma ampla gama de polímeros (poli-D-lisina), surfactantes e biofilmes para conferir uma carga positiva (catiônica).	(BRAUTASET; ELLINGSEN; EGGELING, 2019)
Eugenol	Produtos de limpeza; cosméticos; alimentos e bebidas; cuidados pessoais e farmacêuticos.	(KHALIL <i>et. al.</i> , 2017; SIGMA ALDRICH, 2021)
Ácido succínico	Solventes e lubrificantes, cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos.	(SAXENA <i>et. al.</i> , 2016)
Sorbitol	Produtos de limpeza; cosméticos; aromas e fragrâncias; alimentos e bebidas; higiene pessoal e farmacêutica.	(MARQUES <i>et. al.</i> , 2016; SIGMA ALDRICH, 2021)
Guaiacol	Produtos de limpeza; cosméticos; aromas e fragrâncias; alimentos e bebidas; higiene pessoal e farmacêutica.	(SIGMA ALDRICH, 2021; VAN ROSSUM <i>et. al.</i> , 2014)

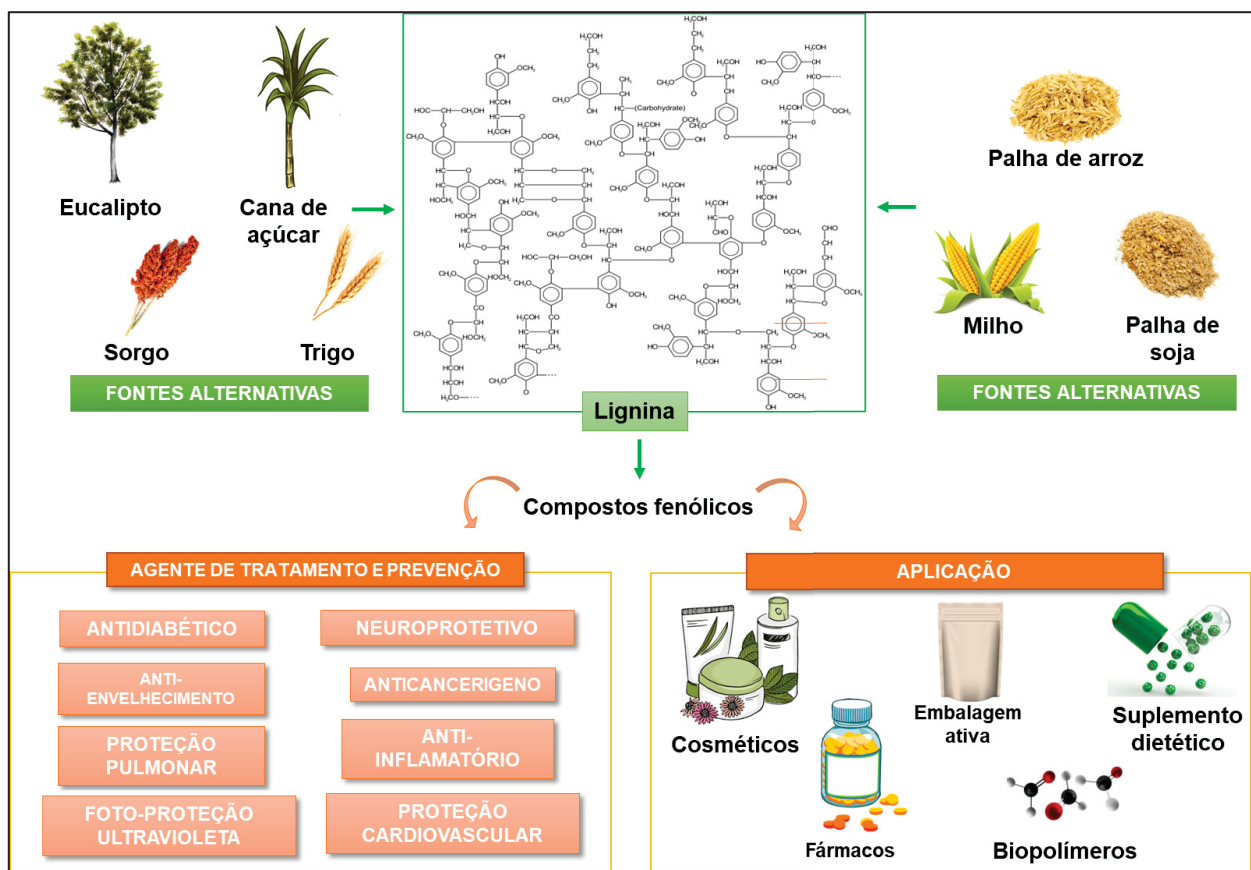
Continuação da Tabela 4

Composto	Aplicações	Referencias
Ácido p-cumárico	Cosméticos; dispositivos médicos (anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético, antiulceroso, antiplaquetário); farmacêuticos.	(ILAVENIL <i>et. al.</i> , 2016)
Etileno	Embalagens de alimentos, garrafas, sacos e outros produtos à base de plástico.	(ARSHAD; FRANKENBERGER, 2002)
p-Cresol	Agricultura, produtos de limpeza, cosméticos, meio ambiente, aromas e fragrâncias, alimentos e bebidas e cuidados pessoais.	(BHATIA <i>et. al.</i> , 2019; SIGMA ALDRICH, 2021)
Seringaldeído	Produtos de limpeza; cosméticos; aromas e fragrâncias; alimentos e bebidas; cuidados pessoais e farmacêuticos.	(SIGMA ALDRICH, 2021)
Sílica	Agente de adsorção; controle de umidade para a indústria alimentícia, de papel e química; e farmacêutica.	(JEELANI <i>et. al.</i> , 2020)
Isobutanol	Solvente para revestimentos de superfície e adesivos (lacas, removedores de tinta, perfumes, limpadores e fluido hidráulico).	(NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021)
Acetona	Solvente para a fabricação de plásticos e outros produtos industriais; cosméticos e produtos de higiene pessoal.	(JATSCH; RUTHER, 2021)

1.4.3. Compostos fenólicos da lignina

Muitos compostos fenólicos são quimicamente ligados à fração de lignina em biomassas lignocelulósicas. Esses compostos fenólicos podem ser extraídos por meio de tratamentos termoquímicos leves e/ou por algumas cepas de fungos e bactérias projetadas. Seu rendimento de extração pode até ser aumentado pela bioengenharia de culturas (Figura 3). Portanto, é possível obter compostos fenólicos de resíduos lignocelulósicos (RODRIGUEZ *et. al.*, 2021), e disponibilizá-los comercialmente.

Figura 3. Compostos fenólicos da lignina: fontes alternativas, estrutura e aplicações.



1.4.3.1. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (FA) possui um grande valor comercial em termos de qualidades funcionais e aplicação no setor cosmético/farmacêutico (LAU; HARBOURNE; ORUÑA-CONCHA, 2020). O FA tem sido usado em formulações cosméticas para a renovação das camadas da pele, como um potente antioxidante em produtos cosméticos e medicamentos, como um agente para o controle do diabetes mellitus e do colesterol, e para proteção neurológica (LE *et. al.*, 2019).

No entanto, um grande obstáculo para difundir seu uso e consumo é o alto custo de produção, o que implica em um alto custo dos produtos associados (cada grama de FA purificado, componente padrão da farmacopeia europeia, corresponde a US\$ 2,46, conforme consulta à Sigma-Aldrich Ltd.) (ALDRICH, 2020). A principal forma de obtenção do AF é a extração de plantas como *Allium cepa* (ARAGÃO *et. al.*, 2020), *Allium sativum* (PHAN *et. al.*, 2019) e Chá de Rooibos (EPURE *et. al.*, 2019),

envolvendo processos complexos e de alto custo para sua purificação. Uma rota alternativa para obter FA é a microbiológica ou enzimática, usando como fontes diferentes partes de milho, trigo, beterraba e arroz, conforme mostrado na Tabela 5. Entretanto, a complexidade de sua purificação por meio de coluna cromatográfica ainda permanece (UPADHYAY *et. al.*, 2020).

Tabela 5. Estudos que relatam a produção de ácido ferúlico (FA) por meio de rota biológica.

Tratamento	Matriz	Componentes obtidos	Referência
Ferulol esterase obtida pelo <i>Clostridium thermocellum</i>	Espiga de milho	1,69 g de ácido ferúlico por quilo de substrato	(LAU; HARBOURNE; ORUÑA-CONCHA, 2020)
Uso de ferulol esterase produzida por <i>Lactobacillus crispatus</i> S524	Farelo de trigo	1,86 mg of ácido ferúlico produzido em 2,0 g de substrato	(XU; WANG; ZHANG, 2019)
Uso combinado de alcalase e termamyl após explosão de vapor	Farelo de trigo	0,82 a 1,05 g ácido ferúlico e ácido p-cumárico por quilo de substrato	(FERRI <i>et. al.</i> , 2020)
Ferulol esterase produzida por <i>Lactobacillus fermentum</i> JN248	Farelo de trigo sem amido	60,7% de ácido ferúlico e ácido p-cumárico extraído da matriz comparado ao tratamento químico mais eficiente aplicado sobre a mesma matriz	(DENG <i>et. al.</i> , 2019a)
Ferulol esterase obtida por bioreation of <i>Enterococcus lactis</i> SR1	Farelo de trigo	1,39 mg de ácido ferúlico por g de substrato	(SHARMA <i>et. al.</i> , 2019)
	Polpa de beterraba	2,56 mg de ácido ferúlico por g de substrato	
	Farelo de milho	1,45 mg de ácido ferúlico por g de substrato	
	Farelo de arroz	0,87 mg de ácido ferúlico por g de substrato	

1.4.3.2. Ácido p-cumárico

A biorrefinaria com biomassa lignocelulósica pode ser usada como uma rota para produzir compostos cumáricos, especialmente quando um alto percentual de lignina é encontrado na parede celular da biomassa. Atualmente, a biossíntese microbiana (Ferulol-CoA 6'-hydroxilase e 4-coumarato CoA ligase) surgiu como uma solução para a obtenção de cumarinas (scopoletina, umbelliferona, esculetina e 4-hydroxycoumarina) de lignina (ZHAO *et. al.*, 2020). Da mesma forma, as cepas recombinantes (*Corynebacterium glutamicum*) associado a substâncias orgânicas, como o undecanol, pode extrair 97% do ácido p-cumárico e melhorar sua conversão enzimática em 4-vinilfenol. Os derivados de vinilfenol têm alto valor agregado devido ao seu uso como precursores de biopolímeros, perfumes e aditivos alimentares (RODRIGUEZ *et. al.*, 2021). *Pseudomonas putida* KT2440 também é uma cepa promissora para o aprimoramento biológico da lignina. Sua versatilidade metabólica e flexibilidade genética contêm um número substancial de vias catabólicas aromáticas relevantes para os compostos cumáricos e a extração de ácido ferúlico (MOHAMED *et. al.*, 2020). Além disso, eles têm maior tolerância à toxicidade desses compostos devido à integridade da membrana. O *Saccharomyces cerevisiae* usado como uma via de funil biológico pode reduzir o metabolismo adicional dos intermediários e a geração de subprodutos indesejáveis. Essa canalização de monômeros derivados da lignina é capaz de produzir proteína-ácido proteico a partir do ácido p-cumárico (720 mg L⁻¹) e ácido ferúlico (120 mg L⁻¹), contribuindo com a melhora da bioeconomia quando utilizado o tratamento biológico sobre a lignina para a obtenção de compostos aromáticos (ZHANG *et. al.*, 2021).

1.4.3.3. Ácido glutâmico

A biomassa ligninolítica é um exemplo de fonte alternativa sustentável e de baixo custo para a produção de compostos valiosos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; REN; TAO; CUI, 2020). Entre os polímeros de alto valor agregado obtidos da lignina, há o ácido poli-γ-glutâmico (γ-PGA). Esse biopolímero tem várias aplicações, como agente

espessante, anticongelante, antiaderente e de alívio do amargor (JOHN; SALIHU; ONYIKE, 2020).

A produção de γ -PGA pode ser obtida por meio de processos ácidos, básicos, biológicos ou uma combinação desses processos. Ren, Tao & Cui (2020) produziu $6,23 \pm 0,13$ mg de γ -PGA por grama de casca de mandioca, usando um meio de reação com ácido cítrico (1% p/p) e sulfato de amônio (0,5% p/p) e *Bacillus subtilis* como agente biológico. Outros substratos foram estudados para a obtenção de γ -PGA, como caule de milho e farelo de soja, com um rendimento máximo de $116,88 \pm 5,05$ g de γ -PGA por quilograma de material sólido, com *Bacillus amyloliquefaciens* como catalisador biológico (FANG *et. al.*, 2020).

1.4.3.4. Ácido láctico

O ácido láctico tem muitas aplicações nos setores alimentício, farmacêutico e de polímeros (SCHROEDTER *et. al.*, 2021; SUN *et. al.*, 2020). Os estereoisômeros do ácido L-(+)-láctico e do ácido D-(-)-láctico são usados para a produção de ácido polilático (PLA), um composto alternativo biodegradável para a produção de plásticos. A biomassa lignocelulósica é uma fonte alternativa viável e de baixo custo para a obtenção de compostos L-(+)-lácticos a partir da cepa bacteriana *Bacillus coagulans*. A fermentação simultânea e a via de sacarificação podem resultar na produção de ácido láctico com alta pureza óptica (SCHROEDTER *et. al.*, 2021).

Além disso, é possível desenvolver filmes usando a reação de copolimerização de lignina e ácido láctico (CHAUBEY; AADIL; JHA, 2021; SUN *et. al.*, 2020; YANG *et. al.*, 2020b). A lignina é um modificador de endurecimento promissor para o PLA devido ao seu baixo custo, química verde e característica biodegradável (CHAUBEY; AADIL; JHA, 2021). Entende-se como química verde ou processamento verde como estruturas e tratamentos de base biológica ou química com menor potencial destrutivo ao ambiente que apresente sustentabilidade em sua aplicação (BRADU *et al.*, 2002). Essa associação permite o desenvolvimento de polímeros de baixo custo, dúcteis e totalmente sustentáveis (SUN *et. al.*, 2020). A associação copolimérica resolve algumas limitações intrínsecas, como alta fragilidade, baixa temperatura de amolecimento, propriedades fracas de barreira a gases e vapor de água, estabilidade

térmica, sensibilidade à baixa umidade, envelhecimento físico prematuro e baixa resistência ao impacto (CHAUBEY; AADIL; JHA, 2021). Portanto, novas aplicações estão sendo promovidas nos setores alimentício e farmacêutico, principalmente em embalagens de alimentos, implantes cirúrgicos e materiais impressos em 3D, entre outros.

1.4.4. Sílica

As biomassas agroindustriais têm diferentes compostos em sua estrutura que lhes conferem resistência física e capacidade de armazenamento de nutrientes. Um desses compostos nos resíduos agroindustriais é a sílica (INDRIANI *et. al.*, 2019). A sílica é um produto que pode ser incorporado a um polímero e usado como agente adsorvente. Ele é amplamente aplicado como controlador de umidade no armazenamento e na preservação de produtos (SHEN; ZHANG, 2019), na medicina (FANG *et. al.*, 2019), e embalagem de alimentos (MA *et. al.*, 2019; VERDÚ *et. al.*, 2020). O uso de sílica em sachês ou diretamente nos alimentos é aprovado por agências como a Food and Drug Administration (FDA) e a Food and Agriculture Organization (FAO) (FERRI *et. al.*, 2020). Possui características de resistência termomecânica (FERNANDES *et. al.*, 2017) e é um constituinte fundamental em estruturas como o vidro (HAN *et. al.*, 2019) e cimento de alto desempenho (DU; PANG, 2019). Assim, a sílica pode ser aplicada a uma variedade de processos no setor de alimentos, como na detecção de toxinas (ligação com compostos luminescentes) (ALTUNBAS; OZDAS; YILMAZ, 2020), como agente de encapsulamento com propriedades antimicrobianas (MELENDEZ-RODRIGUEZ *et. al.*, 2019), para adsorção de enzimas em aerogéis de sílica e antioxidantes de matrizes alimentares (BREZOIU *et. al.*, 2019).

Os métodos convencionais de obtenção de sílica envolvem hidrólises ácidas e alcalinas, seguidas de lavagem do material lignocelulósico. Esses métodos também consistem na queima do material residual em uma mufla, o que gera cinzas e impede o uso completo dos resíduos. No entanto, métodos alternativos que usam pré-tratamentos químicos e físicos isolados ou híbridos de lignocelulose foram estudados (ASKARULY *et. al.*, 2020; MIRMOHAMADSADEGHI; KARIMI, 2020).

Kaya, Yilmaz e Deveci (2020) usaram tratamento alcalino para a matriz de cinzas de vagem de feijão, seguido de tratamento térmico, e recuperaram xerogéis e aerogéis de sílica com uma área de superfície de $270 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ do substrato. Por outro lado, Wee *et. al.* (2019) utilizaram tratamento ácido seguido de tratamento térmico para cascas de arroz. Nesse estudo, eles obtiveram sílica sintetizada com estruturas de 3,00 a 4,25 μm , cuja recuperação apresentou alto grau de pureza (98,00%). Fernandes *et. al.* (2020) utilizou tratamento químico seguido de tratamento térmico para a casca de arroz, obtendo uma recuperação de sílica com uma área de superfície de $290 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ do substrato. Esses exemplos demonstram a importância da reutilização de subprodutos globais para biorrefinarias. O alto valor comercial e o grande volume de vendas dos produtos secundários de resíduos agroindustriais demonstram que a expansão de uma escala laboratorial para uma planta industrial torna-se atraente para as biorrefinarias que detêm essas fontes e, na maioria dos casos, a tecnologia necessária para sua produção. Entretanto, a viabilidade da implementação comercial baseia-se na análise do custo de produção (TSAGKARI; KOKOSSIS; DUBOIS, 2020).

Novas possibilidades são propostas para aumentar a eficiência das plantas comerciais existentes. As mais importantes são os custos operacionais, a reutilização da matéria-prima em outros processos relacionados à produção, os custos de manutenção de equipamentos e os custos de refinamento, gerando, assim, uma diminuição dos resíduos que antes eram descartados e obtendo coprodutos do processo (PRASETYO *et. al.*, 2020; TSAGKARI; KOKOSSIS; DUBOIS, 2020).

1.5. CONCLUSÃO PARCIAL

Os sistemas de biorrefinaria têm sido amplamente estudados e divulgados na comunidade científica e governamental. Entre estes sistemas, os da Fase III vêm ganhando destaque. A complexidade dos tratamentos tradicionalmente aplicados tem sido minimizada com técnicas e procedimentos mais simples, como nos tratamentos biológicos. Tais técnicas vêm ganhando destaque devido à ampla ação nas culturas disponíveis em larga escala, proporcionando a geração de compostos fenólicos e gerando a menor quantidade ou a nulidade de resíduos. Assim, a associação dos processos tradicionais de obtenção de combustíveis com os de obtenção de biocompósitos aumenta a possibilidade de implementação efetiva. Essa possibilidade se deve aos valores comerciais dos biocompostos que atendem à demanda do mercado e têm grande aplicação, como em produtos farmacêuticos, biopolímeros, biossensores, bioabsorventes, nanocompósitos e hidrogéis. Assim, a implementação de um sistema completo de biorrefinaria, utilizando tratamentos específicos como o biológico, proporciona a geração de compostos com alta qualidade e alto valor agregado, aumentando a viabilidade econômica, ambiental e social.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

2.1. INTRODUÇÃO

O processamento e a pós-colheita de matrizes alimentares correspondem a quase 50% dos resíduos industriais gerados, sendo assim os países com uma economia predominantemente agropecuária são os maiores geradores destes resíduos. Estima-se que 30% da maior parte da fruta é perdida no processo. Para os vegetais, estima-se que cerca de 35% do produto resulte em desperdício direto. Além disso, os cereais em seu processamento perdem até 50% de sua massa inicial, gerando um alto volume residual (CATTANEO *et. al.*, 2021).

Alguns tratamentos podem beneficiar ou modificar a estrutura das matrizes lignocelulósicas, gerando diversos produtos e coprodutos, como carboidratos de cadeia longa ou curta e lipídios. Tais produtos podem ser utilizados em processos fermentativos diversos, inclusive para a obtenção de biocombustíveis (NAYAK; BHUSHAN, 2019).

Deste modo, as matrizes, por possuírem características e constituições distintas, necessitam da caracterização dos constituintes, para assim definir o melhor tratamento a ser aplicado sem a perda de produtos com interesse comercial (COOPER *et. al.*, 2020). Matrizes como casca de abacaxi (BANERJEE *et. al.*, 2021), casca e semente de maçã, banana, manga e melão (TEDESCO *et. al.*, 2021; ZANIVAN *et. al.*, 2021), semente e pele de tomate cereja (BAKER *et. al.*, 2022) e até mesmo a casca de soja demonstram potencial para a obtenção de produtos de alto valor agregado (TANGKHAWANIT; SIRIAMORNUN, 2021).

Outras culturas geradoras de resíduos, como o arroz (MARTILLANES *et. al.*, 2021), sorgo (PUNIA *et. al.*, 2021) e aveia (MARTÍN-DIANA *et. al.*, 2021), foram estudadas e demonstraram grande potencial na geração de coprodutos, tais como compostos fenólicos e açúcares (MARTÍN-DIANA *et. al.*, 2021).

O potencial produtivo de novos substratos/resíduos tem sido estudado com base na composição estrutural da fração celulósica. Alguns estudos demonstram que a casca do eucalipto (REINA *et. al.*, 2016), resíduos de madeira de construção (BOBOESCU *et. al.*, 2018), resíduos agrícolas, como palha de trigo e arroz (FERRI *et. al.*, 2020; INDRIANI *et. al.*, 2019), plantas aquáticas (KNOTHE; RAZON, 2017), e resíduos agroindustriais, tais como cascas de banana e de uva (DZIADAS; JELENÍ,

2016; SILVA *et. al.*, 2018; SOUZA *et. al.*, 2019) são amplamente utilizados neste contexto. Essas alternativas estão associadas a tratamentos específicos, como o uso de ácidos, alcális e também os combinados, como tratamentos químicos seguidos de tratamentos microbiológicos, com resultados promissores obtidos (ALVES *et. al.*, 2019; BECHARA *et. al.*, 2018; BOBOESCU *et. al.*, 2018; SOUZA *et. al.*, 2019; VAZ *et. al.*, 2019).

Neste contexto, quatro matrizes foram utilizadas neste trabalho, por possuírem características distintas e quanto a sua disponibilidade: a casca de arroz, o bagaço de cana, a casca de jaboticaba e o bagaço de uva. Tais matrizes serão melhor discutidas abaixo.

2.1.1. Casca de arroz

A casca de arroz é um resíduo agrícola abundante e atualmente pouco aproveitado para obtenção de outros produtos. Dentre os usos mais comuns são para a obtenção de energia, através de sua queima. Um estruturante presente nesta matriz residual é a sílica, com ampla gama de aplicações, como na fabricação de chips, zeólitas e catalizadores (PODE, 2016). Estudos evidenciam que o material é um poderoso biosorvente, devido a sua estrutura porosa (ZOU; YANG, 2019).

Tais características se devem ao fato de a casca de arroz possuir uma estrutura rica em celulose, hemicelulose, lignina e sílica. Com isso a porosidade estrutural foi estudada por Chen *et. al.* (2020) e observado um significativo aumento desta, após os tratamentos de carbonização, remoção de sílicas e ativação sendo correlacionada e atribuída a cada parte da estrutura *in natura* seca.

Contudo a casca de arroz possui inúmeros estudos no tratamento da matriz lignocelulósica na liberação de compostos fenólicos por extração, para a obtenção de ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e proantocianidinas. Tais moléculas possuem características antioxidantes, sendo potencialmente utilizados na produção de fármacos e na conservação de alimentos (CIULU; DE LA LUZ CÁDIZ-GURREA; SEGURA-CARRETERO, 2018).

Wanyo, Meesp e Siriamornpun (2014), obtiveram após tratamentos com ar quente, radiação infravermelha e celulase um produto com elevada atividade

antioxidante (DPPH e FRAP) e compostos fenólicos totais (CFT). Tais valores foram atribuídos ao aumento significativo de α e γ -tocoferóis, ácido vanílico e ácido ferúlico, após a avaliação cromatográfica.

2.1.2. Bagaço de cana

O bagaço de cana é outro resíduo industrial em abundância no Brasil, visto que o caldo de cana é utilizado para a produção de açúcar e álcool. No entanto, a maior parte se torna resíduo e é utilizada para geração de calor nas indústrias. Sua fração seca é constituída basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY *et. al.*, 2000).

Majoritariamente, o bagaço de cana de açúcar é usado para produção de energia, contudo estudos demonstram que sua estrutura, após tratamentos enzimáticos, fica exposta, assim liberando açúcares redutores, e ácidos orgânicos, sendo possível a utilização destes compostos na produção de biocombustíveis (ALOKIKA *et. al.*, 2021).

O pré-tratamento do bagaço de cana vem apresentando resultados significativos na produção de compostos fenólicos. Após a oxidação úmida e explosão de vapor, sequenciada a tratamentos alcalinos ou ácidos, notou-se um aumento da concentração de fenólicos obtidos no tratamento combinado, quando comparado ao uso individual. Dentre os produtos gerados, se destaca os ácidos p-cumárico e o ácido ferúlico, além de ácidos orgânicos, aldeídos e cetonas, como resultado das condições oxidativas aplicadas na matriz em questão (MARTÍN *et. al.*, 2007).

Além dos tratamentos químicos, os tratamentos enzimáticos, utilizando xilanase e ferulol esterase, demonstraram que são capazes de gerar compostos como xilo-oligossacarídeos, probióticos naturais, compostos fenólicos e moléculas antioxidantes. Tais moléculas são amplamente utilizadas em indústrias farmacêuticas, alimentícias e também na produção de biocombustíveis (MANDELLI *et. al.*, 2014).

Outros estudos demonstraram que os extratos hidroalcóolicos obtidos possuem alta atividade antioxidante. Compostos como éter 4-O-guaiacilglicerílico de tricina, 7-O-glucopiranosídeo, genistina, ácido p-cumárico, quercetina e genisteína foram identificadas utilizando UHPLC-HR-TOFMS, apresentando como potencial para

obtenção de compostos bioativos e, conseqüentemente, uma viabilização econômica do processo (ZHENG *et. al.*, 2017).

2.1.3. Casca de jaboticaba

A Jaboticaba (*Plinia cauliflora*) é um fruto de grande consumo *in natura* pela população brasileira. Seu fruto é rico em compostos fenólicos e a principal geração de subprodutos oriundos do processamento deste fruto é sua casca. Tais resíduos vem sendo amplamente estudados, principalmente para possíveis aplicações nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (ALBUQUERQUE *et. al.*, 2020; MAROLDI *et. al.*, 2022).

Seu uso industrial ainda é restrito, sendo principalmente utilizada nas indústrias de sucos, geleias e extratos. No entanto, seu potencial residual não vem sendo utilizado na extração de compostos específicos, sendo na maioria das vezes direcionados para geração energética (OLIVEIRA; SILVA; FILHO, 2020; RADAELLI *et. al.*, 2020). Incontáveis constituintes fenólicos foram detectados em estudos sobre a casca de jaboticaba, tais como compostos fenólicos, tocoferóis e ácidos orgânicos (ALBUQUERQUE *et. al.*, 2020).

Sistemas de biosorção utilizando a casca da jaboticaba vem sendo estudados e sua bioacessibilidade avaliada em simulação digestiva. Tais estudos evidenciaram que leveduras adsorvidas com tais extratos apresentaram uma entrega de metabólitos secundários de modo a preservar as atividades antioxidantes e a bioacessibilidade das moléculas (MAROLDI *et. al.*, 2022). Outros estudos detectaram compostos essenciais e de uso comercial nas diversas partes do fruto, como elastina, antocianinas e flavonóis (DE ANDRADE NEVES *et. al.*, 2021).

Além disso, filmes poliméricos constituídos por amido de milho, glicerol e farinha da casca de jaboticaba demonstraram propriedades mecânicas e de barreira significativas. Foi observado também uma baixa permeabilidade de vapor, solubilidade e capacidade de retenção de água, sendo caracterizado como uma possível aplicação de embalagem biodegradável (RIBEIRO SANCHES *et. al.*, 2021).

Diante as possibilidades ante a obtenção de compostos fenólicos, o pré-tratamento utilizando água subcrítica auxiliado à digestão anaeróbia demonstrou alta

rentabilidade energética utilizando a casca de jaboticaba como substrato reacional. Além disso, apresentou alto fluxo na economia circular deste processamento, possibilitando a geração de bioenergia e, concomitantemente, fertilizantes agrícolas provenientes dos resíduos reacionais, possibilitando uma redução das emissões gasosas dos sistemas industriais tradicionais e, conseqüentemente a minimização de resíduos provenientes de indústrias alimentícias (DA ROSA *et. al.*, 2023).

2.1.4. Bagaço de uva

A uva é um produto amplamente conhecido por ser produzidos ao longo de todo o ano, devido a melhoramentos genéticos da planta, para atender a demanda comercial de qualidade. A competitividade e a garantia de qualidade do fruto aquecem o mercado brasileiro (BONANNO; CAVALCANTI, 2012).

O fruto é utilizado principalmente nas indústrias de vinho, de suco e de geleias. Seu principal resíduo (25% do peso total do fruto) é o bagaço de uva. Tal resíduo é amplamente utilizado nas indústrias de ração animal, farmacêutica, cosmética e alimentícia (BERES *et. al.*, 2017).

O bagaço de uva é um importante resíduo rico em compostos fenólicos. Tais compostos possuem grande bioatividade, como agente antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno. Sua composição fenólica auxilia no fluxo digestivo, contribuindo assim aos efeitos positivos a saúde humana e também o uso das fibras dietéticas no metabolismo de tais polifenóis (STAFUSSA *et. al.*, 2016; YANG *et. al.*, 2022).

Estudos envolvendo o bagaço de uva demonstrou a presença de flavonóides, flavonas, derivados do ácido hiroxibenzóico, derivados do ácido hidroxínico e éster metílico do ácido ferúlico. Além disso, foi observado nos extratos alcoólicos do bagaço efeitos microbiostáticos e microbiocidas quando aplicados em *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em sistemas *in vitro* (GHENDOV-MOSANU *et. al.*, 2022b).

Além da extração de fenólicos, o bagaço de uva vem sendo estudado quanto a seu potencial de obtenção de energias renováveis e na geração de açúcares fermentescíveis. Contudo a estrutura complexa dos polissacarídeos do bagaço de uva

necessita ser hidrolisada para que haja uma melhora na eficiência fermentativa do processo (KORKIE; JANSE; VILJOEN-BLOOM, 2017).

Com isso, este capítulo visa avaliar a composição das matrizes (bagaço de cana de açúcar, bagaço de uva, casca de arroz e casca de jaboticaba) e caracterizá-las utilizando métodos convencionais, espectrofotométricos e microscopia eletrônica de varredura, de modo a obter matrizes significativamente distintas entre si e, nos próximos capítulos, obter um sistema único para a obtenção de fenólicos e açúcares redutores com alta viabilidade e rentabilidade econômica.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Matrizes experimentais

Para a execução dos experimentos, quatro matrizes foram utilizadas:

- Bagaço de cana de açúcar: obtida de Costa Bioenergia, indústria localizada em Umuarama – Paraná - Brasil;
- Bagaço de uva: obtida de uma indústria na região de Toledo – Paraná - Brasil;
- Casca de arroz: obtida de uma fazenda experimental localizada em Botucatu – São Paulo – Brasil;
- Casca de jaboticaba: obtida por doação de consumidores locais, da cidade de Curitiba – Paraná - Brasil.

As amostras, após a secagem, foram processadas em moedor angular do tipo cerâmica (moedor comercial, com ajuste de distância entre os discos de cerâmica da abertura). As amostras moídas foram submetidas ao peneiramento e coletadas as frações que transpassaram o Mesh 35 (0,5 mm de abertura) foram coletadas e submetidas às análises posteriores e aos experimentos ao longo do trabalho. Convencionou-se então que todas as partículas possuem diâmetro médio (casualidade da esfericidade da partícula) inferior à 0,5 mm.

2.2.2. Caracterização das amostras

A caracterização foi realizada a fim de avaliar as características de cada matriz e compará-las ao término das análises. Com isso, as amostras foram avaliadas quanto a composição (padrão ABNT), análise espectrofotométrica (MIR-ATR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados obtidos foram interpretados utilizando ferramentas estatísticas como o Teste de Tukey e Análise de componentes principais.

2.2.2.1. Composição

A determinação foi realizada ante as normas vigentes (ABNT) para os substratos a serem utilizados. São elas:

a) Umidade

A metodologia aplicada seguiu o método gravimétrico, onde a amostra foi submetida a secagem em estufa e sua massa acompanhada ao longo do tempo, até sua manutenção (tempo máximo de secagem observada é de 2 horas). O percentual de umidade foi obtido por Eq. 1, onde M_i é a massa da amostra antes da secagem e M_f é a massa da amostra após a secagem. A base seca foi utilizada nas análises posteriores.

$$\%umidade = \frac{M_i}{M_f} \cdot 100 \quad \text{Eq. 1}$$

b) Cinzas

A metodologia aplicada seguiu conforme ABNT NBR 13999, onde a amostra foi incinerada em chama e submetida em mufla a 550°C por 4 horas ou total carbonização da amostra. Seguidamente foi resfriada e mantida em dessecador até que ela atingisse temperatura ambiente. Com isso a quantidade de cinzas foi obtida pela aplicação de Eq. 2, onde M_i é a massa da amostra antes da carbonização e M_f é a massa da amostra após a carbonização.

$$\%cinzas = \frac{M_i}{M_f} \cdot 100 \quad \text{Eq. 2}$$

c) Extrativos

A metodologia aplicada seguiu conforme ABNT NBR 14853, onde a amostra foi acondicionada em suportes e submetidos a extração pelo método de Soxhlet. A

extração seguiu por duas horas, após isso as porções extraídas foram submetidas a roto-evaporador e seguidamente quantificadas referente ao seu peso. Tal análise se refere ao percentual de metabólitos secundários obtidos (conforme Eq. 3), com propriedades específicas da planta, como ceras, taninos, óleos e resinas, por isso a importância desta etapa.

$$\%extrativo = \frac{Massa_{extrato}}{Massa_{inicial}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

d) Lignina

A metodologia aplicada seguiu conforme ABNT NBR 7989. Após a reação a fração sólida foi mensurada e o percentual de lignina foi obtido pela Eq. 4.

$$\%lignina = \frac{Massa_{após\ a\ reação}}{Massa_{inicial}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

e) Celulose e hemicelulose

O percentual de celulose e hemicelulose é obtido por Eq. 5. Tal cálculo estima o carboidrato presente na amostra quando retirados os demais componentes da totalidade da amostra.

$$\%celulose\ e\ hemicelulose = 100 - (\%extrativos + \%lignina + \%cinzas + \%umidade) \quad \text{Eq. 5}$$

2.2.2.2. Análise espectrofotométrica de lignina em brometo de acetila

Método descrito por Moreira-Vilar *et. al.* (2014): Foi utilizado 20 mg de amostra e 0,5 mL de 25% de brometo de acetila (v/v em ácido acético glacial) e incubado a 70°C por 30 minutos. Posteriormente foi resfriado e adicionado 0,9 mL de NaOH (2M), 0,1 mL de hidroxalamina-HCl (5M) e completado o volume de cobertura amostral utilizando ácido acético glacial (4-6 mL). A amostra tratada foi centrifugada (1400 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante utilizado para leitura de absorbância a 280 nm. O

equipamento utilizado para leitura de absorbância foi BEL Photonics (UV-M51) com cubetas de Quartzo. A curva padrão foi constituída por aumento da concentração de lignina pura (95% de pureza – Sigma Aldrich) e esta demonstrada no APÊNDICE 1. Tal análise é uma alternativa aos métodos tradicionais visando uma redução do tempo de análise e uma agilidade na obtenção de resultados, sendo necessário avaliar a efetividade e a confiabilidade ante os métodos tradicionais, como baixo desvio padrão da triplicata dos resultados apresentados.

2.2.2.3. Espectroscopia (MIR-ATR)

A análise ocorreu com a inserção da amostra direta no equipamento, de modo a avaliar a intensidade e/ou possíveis deslocamentos de bandas correspondentes ante aos compostos de interesse, lignina, hemicelulose e celulose. Foi utilizado um espectrômetro (Bruker, Vertex 70) equipado com cristal carbono, em uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com acessório de refletância total atenuada (MIR-ATR) na faixa espectral de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 4 cm^{-1} . A análise foi conduzida no Laboratório de FTIR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a análise das bandas correspondentes foi utilizada as informações da Tabela 6.

2.2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da superfície das matrizes foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR). As micropartículas foram fixadas em suporte de alumínio e submetidas à metalização com ouro sob vácuo (SCD-030). Para visualização das amostras, foram utilizados aumentos de 1000 e 5000x, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Tescan, Vega 3, Kohoutovice, República Tcheca) com potencial de aceleração de 15 kV.

Tabela 6. Características dos picos de celulose, hemicelulose e lignina analisados por espectroscopia (MIR-ATR).

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
890	Vibrações de alongamento C–O–C da ligação β (1→4)-glicosídica característica
1033	Alongamento C-O (celulose, microcristalina)
1240 – 1245	Vibração do anel aromático em guaiacil (lignina)
1319	C-H em flexão plana de celulose I e celulose II
1373	Trecho C–O de celulose e hemicelulose
1429	Unidades condensadas de siringil e guaiacil
1510 - 1515	Vibração no esqueleto de lignina aromática (C=C vibrações de alongamento dos anéis aromáticos de lignina)
1640	Vibração de alongamento C=O em carbonil conjugado de lignina
1730	Cetona/aldeído C=O estiramento (hemicelulose)
2850 - 2852	Grupos metoxil de lignina
3421	OH alongamento – lignina (madeira)

FONTE: Adaptado de MATEI *et. al.*(2019).

2.2.3. Análises estatísticas

2.2.3.1. Teste de Tukey

O Teste de Tukey foi utilizado para avaliar semelhanças e diferenças de valores obtidos quanto a concentrações, percentuais e outras análises. Tal teste executa a comparação das médias, partindo de dados oriundos da análise de variância (ANOVA). Este utiliza o teste F para a análise da diferença mínima significativa (DMS) entre amostras, com uma amplitude estudentizada, quadrado médio dos resíduos da anova e tamanho amostral dos grupos. Porém, não avalia diferenças entre tratamentos, mas sim entre os grupos dentro do mesmo tratamento (ABDI; WILLIAMS, 2010). O teste foi executado utilizando o software Microsoft Excel (2022).

2.2.3.2. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA), foi aplicada utilizando o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2. Primeiramente, os dados (espectros são mais utilizados) são organizados no formato de uma matriz X. Para tanto, cada linha da matriz X contém um grande grupo de dados enquanto cada coluna da matriz X apresenta as informações das variáveis nos diferentes aspectos analisados. O princípio da PCA consiste em decompor a matriz X em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (T) e outra chamada de *loadings* (PT) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). A matriz de *scores* carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz X, enquanto os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de X. Os resultados da decomposição da matriz X em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA *et. al.*, 2016).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Caracterização das matrizes

As amostras processadas foram caracterizadas em seu estado inicial (sem processamento) e estão apresentadas na Tabela 7. A umidade, por ser a água ligada na partícula por ligações fracas, podem ser um interferente direto no processamento das mesmas, como no processamento de grãos ou em extrações (DAMODARAN; PARKIN; OWEN, 2010; SANTOS *et. al.*, 2014). Os resultados obtidos demonstram diferenças entre as matrizes analisadas pelo teste de Tukey. Além disso, quando comparado aos valores da literatura nota-se uma diferença quanto ao percentual contido no bagaço de cana, onde Landa-Ruiz *et. al.* (2021) obteve em suas amostras valores de 6,4% em sua umidade natural. Resende, Oliveira e Franca (2020) determinaram para a casca de jaboticaba valores de 9,94 a 14,99% entre as espécies analisadas. Foram observadas diferenças também para a casca de arroz e bagaço de uva, 14,2% (DU *et. al.*, 2022) e 3,89% (DA SILVA *et. al.*, 2022). Tais diferenças podem ser devido ao pré-processamento das matrizes ou pela armazenagem destas, uma vez que estas foram obtidas em diferentes localidades e necessitam de atenção especial quanto às condições amostrais para posterior uso e manutenção das características estruturais.

O percentual de cinzas estima os minerais presentes na amostra. Tais constituintes podem interferir no processo de modo direto, por ser constituinte da matéria-prima, ou indireto, por meio de resíduos de solo ou demais tratamentos que a matriz foi submetida na indústria (ARAÚJO, 2007; DAMODARAN; PARKIN; OWEN, 2010). Os percentuais de bagaço de cana e casca de jaboticaba se assemelham, enquanto os da casca de arroz e bagaço de uva se diferem entre todas as amostras, pelo Teste de Tukey. Na literatura os valores são similares aos obtidos experimentalmente para bagaço de cana, casca de jaboticaba, casca de arroz e bagaço de uva, respectivamente: $2,71 \pm 0,10$ (SANTOS, 2018), $2,5 \pm 0,04$ (MIRANDA *et. al.*, 2020), $5,9 \pm 0,3$ (KHALEGHIAN; MOLAVERDI; KARIMI, 2017) e $4,90 \pm 0,03$ (ATATOPRAK *et. al.*, 2022), respectivamente.

Tabela 7. Caracterização das amostras quanto aos teores de umidade, cinzas, lignina e carboidratos.

Amostra	Cinzas (%)	Umidade (%)	Extrativos (%)	Lignina (%)	Carboidratos (Celulose e hemicelulose) (%)
Bagaço de cana	2,94 ^c ±0,07	6,44 ^b ±0,12	3,62 ^a ±0,17	20,96 ^a ±0,47	59,85 ^c ±0,21
Casca de jaboticaba	2,90 ^c ±0,03	5,45 ^c ±0,11	3,61 ^a ±0,17	11,92 ^d ±0,64	70,08 ^a ±0,24
Casca de arroz	5,70 ^b ±0,04	7,12 ^a ±0,11	3,79 ^a ±0,14	17,83 ^b ±0,60	59,05 ^c ±0,22
Bagaço de uva	6,75 ^a ±0,03	3,42 ^d ±0,12	3,81 ^a ±0,14	15,71 ^c ±0,66	64,42 ^b ±0,24

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas); Letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

A lignina é um interferente reacional de inúmeras enzimas, como a lacase (SHIN *et. al.*, 2019). Assim a estimativa desta, evidencia a possibilidade na obtenção de fenólicos presente na fração sólida, sendo assim foi um aspecto a ser abordado ao longo deste estudo (RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). Observou-se, utilizando o Teste de Tukey, uma diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos se assemelham aos estimados na literatura para o caso do bagaço de cana em 20,9% (BAKSI *et. al.*, 2019), casca de jaboticaba em 15,1% (MIRANDA *et. al.*, 2020), casca de arroz em 18,1% (KHALEGHIAN; MOLAVERDI; KARIMI, 2017) e se distinguindo quanto ao bagaço de uva em 39,16% (ATATOPRAK *et. al.*, 2022). Tal diferença se deve a proporção de porções estruturantes (como casca, engaço e sementes) presentes nas amostras e a forma de tratamento estabelecida sobre a matriz, como a secagem em temperaturas elevadas que é comumente utilizada industrialmente.

A análise de extrativos avalia a presença de compostos fracamente ligados a matriz de lignocelulose, como carboidratos, proteínas e lipídios. Com isso, altos percentuais de extrativos em água evidenciam que uma maior quantidade de compostos hidrossolúveis estão presentes na amostra (BENOUDAH *et. al.*, 2018). Notou-se que, utilizando o teste de Tukey, as amostras se assemelham entre si ($p \leq 0,05$). Matei *et. al.* (2020) obteve, analisando os extrativos de bagaço de cana e casca de arroz, os valores de 1,31 e 1,19 g por 100 g, respectivamente. Tais resultados se diferenciam dos obtidos neste trabalho, principalmente ante o

tratamento da matriz, como um simples processo de secagem até massa constante (realizado no nosso experimento). Contudo foi possível observar a similaridade percentual destes (3,62 e 3,79 %, respectivamente), com o obtido pela Matei *et. al.* (2020).

Além das diferenças observadas anteriormente, valores estimados de carboidratos (celulose e hemicelulose) também apresentam semelhanças (casca de arroz e bagaço de uva) e diferenças (Bagaço de uva e casca de jaboticaba) entre as amostras, conforme teste de Tukey. Contudo, os valores observados na literatura se diferem dos obtidos neste trabalho, como o descrito por Matei *et. al.* (2020) para o caso do bagaço de cana e da casca de arroz, 67,32 e 31,97 g por 100 g, respectivamente. Por ser uma estimativa, todo fator desconsiderado nos cálculos das demais análises implicam em erros cumulativos, podendo ser possível comparar tais valores.

De modo a facilitar as análises quanto ao percentual de lignina ao longo do processamento e tratamento das matrizes, a metodologia de análise espectrofotométrica de lignina em brometo de acetila foi utilizada. Com isso, para que a estimativa da quantidade de lignina apresenta-se um menor erro possível, os resultados utilizando a técnica de brometo de acetila foram comparados à norma da ABNT NBR 1485.

O desvio padrão e a análise de variância dos dados obtidos estão descritos na Tabela 8. Analisando os resultados descritos na Tabela 8, pôde-se verificar que as amostras mostram similaridade, apresentando um baixo desvio padrão (baixa dispersão dos dados) e variância (baixa distância dos valores obtidos quando comparada à média), mostrando ser possível o uso da técnica na obtenção da percentagem de lignina. A curva padrão está mostrada no APÊNDICE 01.

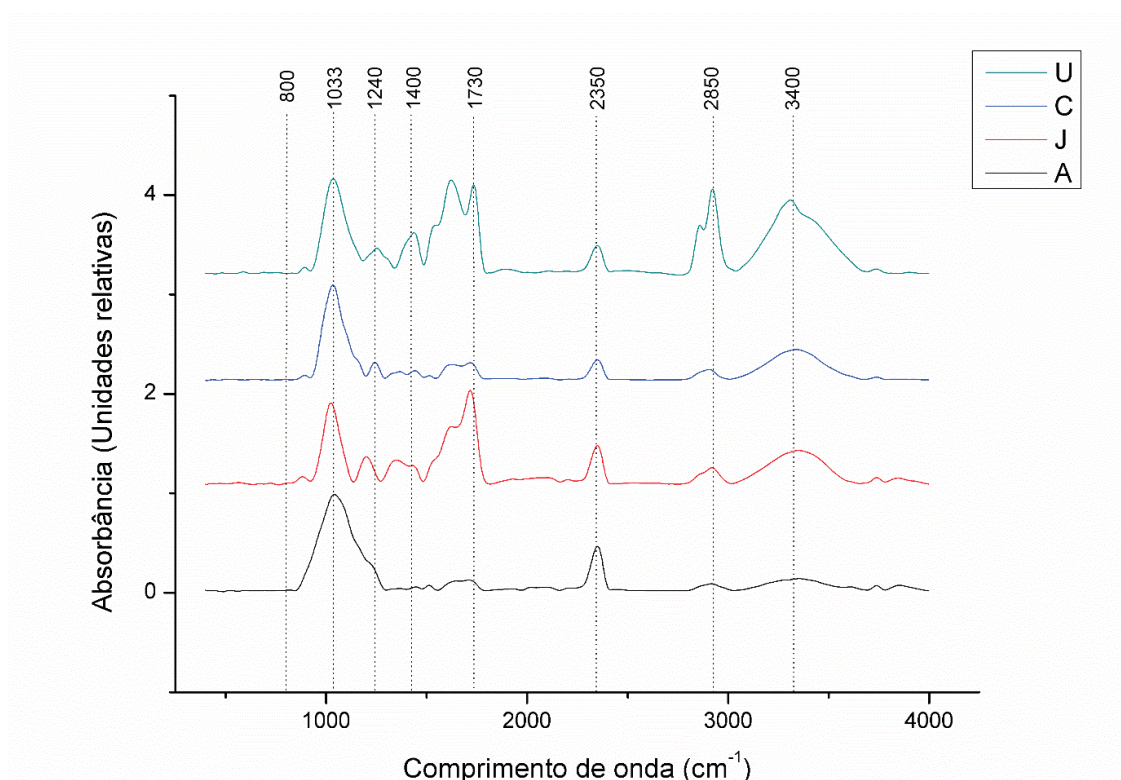
Além de tais análises, foram obtidos espectros em MIR-ATR (Figura 4). Em tal Figura, foi possível observar que as curvas (normalizadas, ajustadas as linhas de base e sobrepostas) demonstram diferenças sob determinados comprimentos de onda. Ocorreu também a presença de um pico característico em 2350 cm^{-1} em todos os espectros. Tal comprimento de onda é correspondente ao grupamento $\text{O}=\text{C}=\text{O}$, e quando o mesmo for citado, não entrará na discussão de constituintes principais por ser um residual do processamento da matriz e não um estrutural primário (SIGMA ALDRICH, 2023). Com isso os dados espectrais passaram pela análise de

componentes principais (PCA), de modo a identificar e comprovar a distinção das características ante as matrizes em questão.

Tabela 8. Comparação dos métodos para obtenção do percentual de lignina.

	Método brometo de acetila (%)	Método ABNT NBR 14853 (%)	Desvio padrão entre os métodos	Variância entre os métodos
Casca de arroz	16,88±0,79	17,83±0,14	0,67	0,45
Bagaço de cana	21,25±0,67	20,96±0,19	0,20	0,04
Casca de jaboticaba	11,71±0,62	11,92±0,25	0,15	0,02
Bagaço de uva	15,72±0,64	15,71±0,19	0,01	≤0,01

Figura 4. Espectros MIR-ATR das amostras sem tratamento.

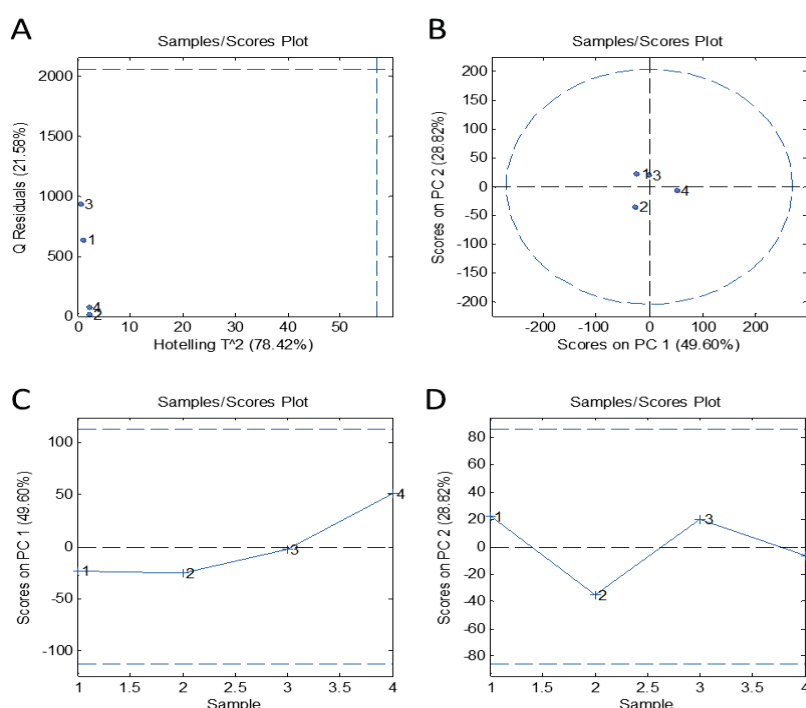


LEGENDA: U: Bagaço de uva; J: Casca de jaboticaba; C: Bagaço de cana; A: Casca de arroz.

Para avaliar os espectros, a Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada na matriz de dados. Foi possível observar que dois componentes principais (*Principal components* – PC's) explicam 78,42% da variância dos dados contidos nos espectros. Na Figura 5-B e 5-C foi possível observar que as matrizes 1 (Casca de Arroz), 2 (Bagaço de cana) e 3 (Casca de jaboticaba) são semelhantes entre si e se

diferem das matrizes 4 (Bagaço de uva) quanto ao PC1. Tal diferença foi identificada na Figura 6-A, onde a faixa espectral compreendida nos comprimentos de onda 1240, 1429, 1457, 1510, 1640, 3400 cm^{-1} (lignina), 1319 cm^{-1} (celulose) e 1373, 1730, 2850 cm^{-1} (hemicelulose) são as que se diferem significativamente entre os quadrantes positivos de tal componente principal. Em PC2 (Figura 5-B e 5-D) temos uma distinção entre os grupos que compreendem as amostras 1 e 3 (Quadrante positivo) do que compreende as de número 2 e 4 (quadrante negativo).

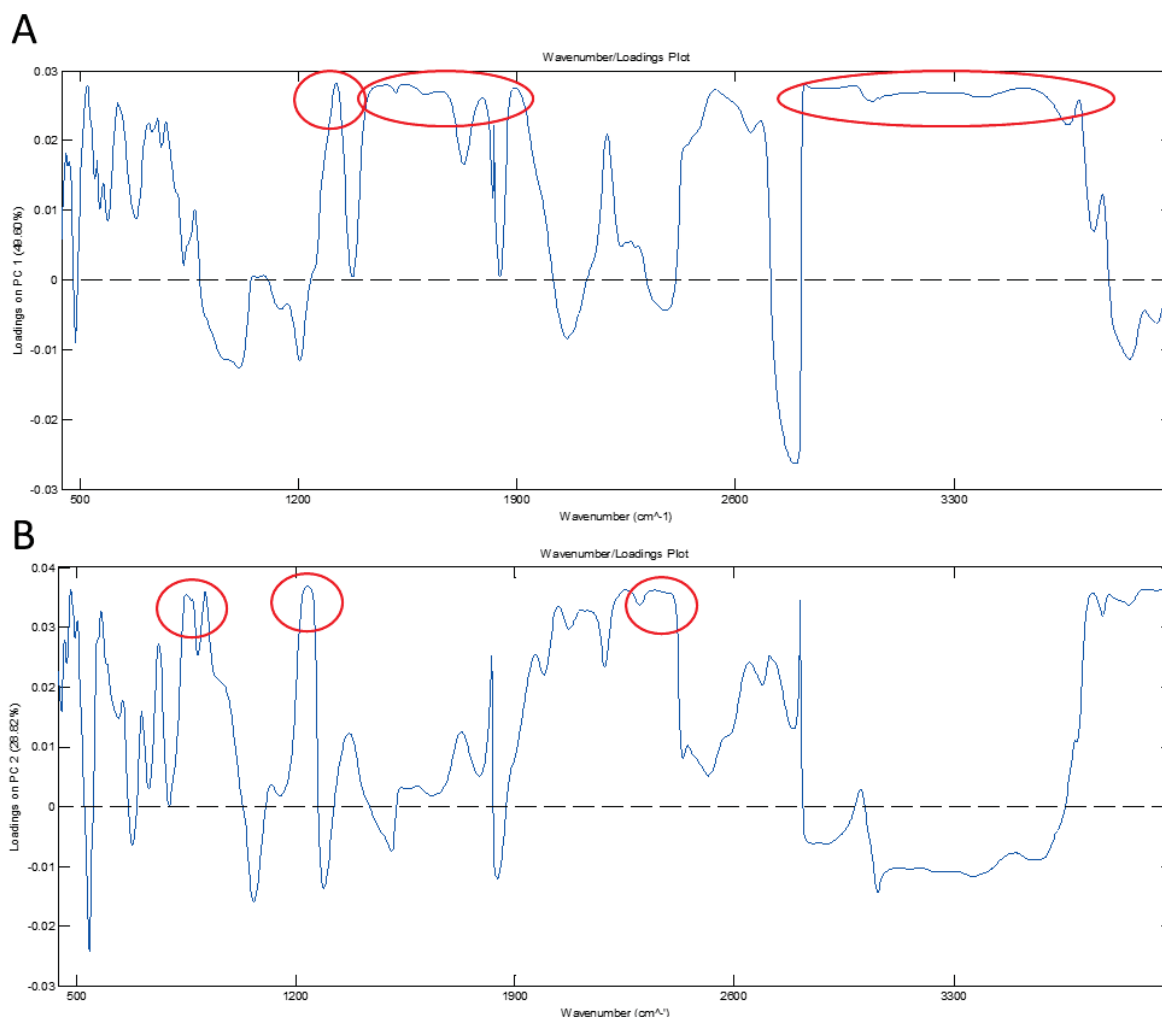
Figura 5. Scores de PC1 e PC2 das amostras.



Legenda: 1- Casca de arroz; 2- Bagaço de cana; 3- Casca de jaboticaba; 4- Bagaço de uva.

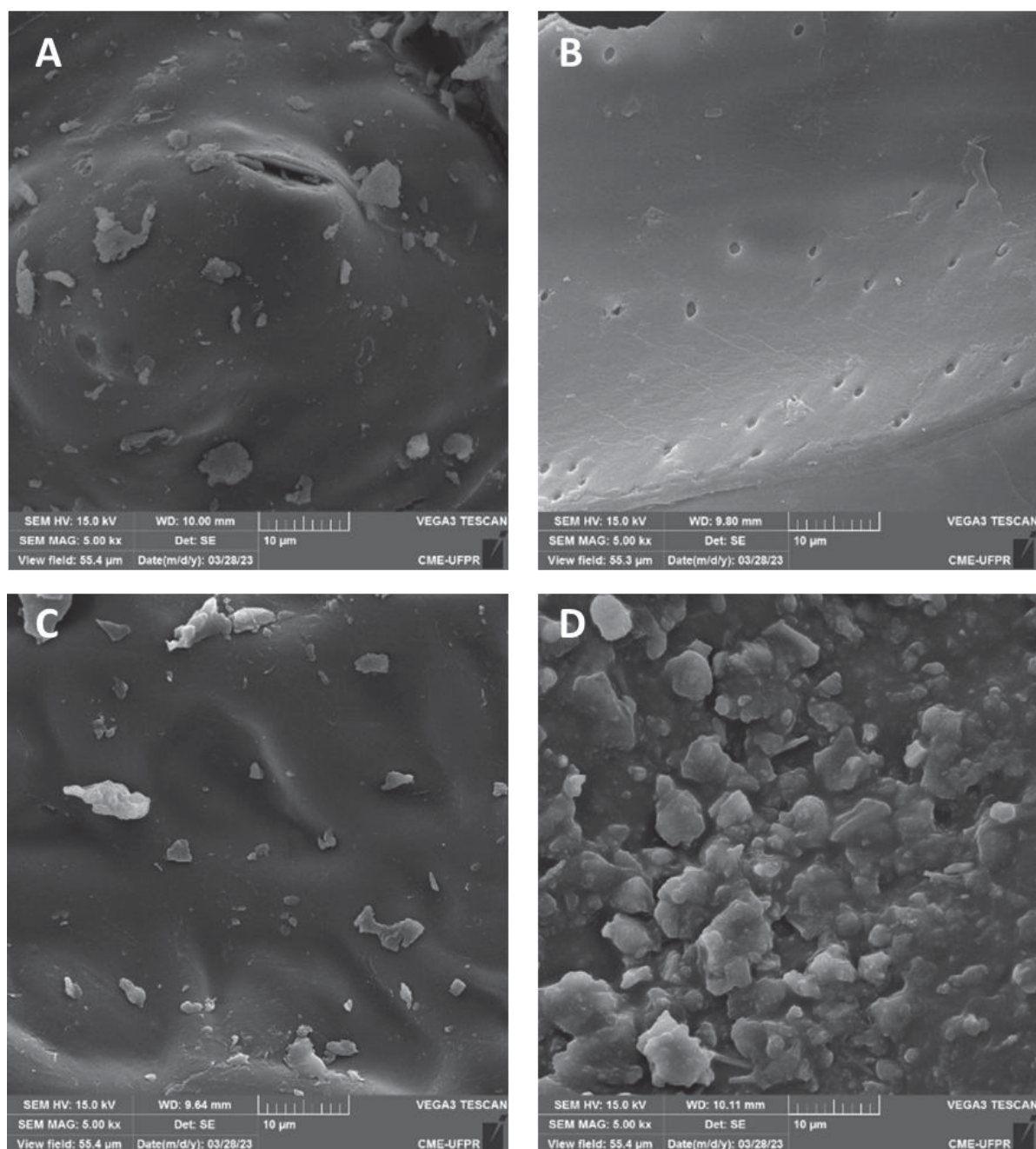
Analisando os *loadings* correlacionados aos comprimentos de onda dos espectros (Figura 6-B) foi possível distinguir tais grupos em 800 cm^{-1} (Siloxano), 1160 cm^{-1} (Celulose) e 2850 cm^{-1} (Lignina). Com isso podemos afirmar que: (1) as matrizes são distintas entre si primordialmente quanto a composição química (Celulose, lignina e hemicelulose); (2) a escolha das matrizes mostram serem adequadas a este estudo, visto que a maior variabilidade de composição ao longo de um mesmo tratamento é de grande valia em um tratamento considerado global; (3) se torna comprovado que as matrizes diferenciadas utilizando o PCA e a constituição química na forma tradicional (analítica) são equivalentes, sendo assim ferramentas estatísticas complementares validadas entre si.

Figura 6. Loadings de PC1 e PC2 das amostras.



Ao avaliar as matrizes quanto as suas características morfológicas (utilizando a MEV) foi possível notar que estas possuem estruturas distintas. A casca de arroz possui uma estrutura porosa rica em silicato formando aglomerados estruturais, conforme o disposto na Figura 7-A e também descrito por Zhang *et. al.* (2020). A casca de jaboticaba e o bagaço de uva (Figuras 7-C e 7-D), por serem frutos com elevada concentração de amido, foi observado a presença de particulados menores dispersos ao longo das amostras. E por fim na Figura 7-B foi possível observar micro poros ao longo da estrutura, que através dos tratamentos industriais liberou, gerando tais modificações estruturais. Deste modo foi possível observar que as matrizes, além de composições distintas, possuem características morfológicas significativamente diferentes entre si.

Figura 7. Imagens obtidas por MEV das matrizes sem tratamento.



LEGENDA: A- Casca de arroz; B- Bagaço de cana; C- Casca de jaboticaba; D- Bagaço de uva.

2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Ao avaliar a composição das matrizes foi possível observar diferenças significativas quanto aos teores de cinzas, umidade, extrativos, lignina e carboidratos. Analisando os compostos de interesse neste estudo, a lignina apresentou distinção entre todas as amostras, com valores de 11,92 a 20,96%, enquanto os carboidratos variaram entre de 59,05 a 70,08%, corroborando para um tratamento idôneo sobre matrizes caracterizadas como distintas entre si. Com isso, a análise espectrofotométrica, auxiliada pelo PCA, mostra divergência dos constituintes lignina (1240, 1429, 1457, 1510, 1640, 3400 cm^{-1}), celulose (1319 cm^{-1}) e hemicelulose (1373, 1730, 2850 cm^{-1}), conforme mostrado pelas análises anteriores. Por fim, a análise morfológica foi realizada utilizando MEV e foi observada a presença de partículas livres nas matrizes da casca de jaboticaba e bagaço de uva; aglomerados estruturais na casca de arroz e estruturas microporosas no bagaço de cana. Com isso foi caracterizada a distinção matricial, tanto em sua composição, quanto em sua estrutura, representando diversidade entre si e a possibilidade da aplicação de um tratamento unificado para matrizes distintas quanto sua constituição.

CAPÍTULO 3: MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRAIS E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.1. INTRODUÇÃO

Diante da intensa busca por alternativas na obtenção de glicose partindo de meios não convencionais, os resíduos provenientes de indústrias alimentícias vêm demonstrando alta rentabilidade, tanto econômica, quanto processual (BECHARA *et. al.*, 2018; SANTOS *et. al.*, 2020).

Contudo o uso de matrizes de lignocelulose se torna dependente ao tipo de tratamento aplicado. As duas fases básicas de tratamento à matriz consistem em um preparo estrutural (fragilização da estrutura e remoção de interferentes) seguido de produção de açúcares redutores (CARVALHO *et. al.*, 2020; CHANDEL; SUKUMARAN, 2017; SANTOS *et. al.*, 2020; SCHNEIDER *et. al.*, 2020). Diante da estrutura complexa das matrizes lignocelulósicas, a lignina é considerada um interferente condicionante ao tratamento, e posterior uso dos coprodutos, a que será aplicada a matriz, como por exemplo interferir na velocidade de reação de enzimas, como a lacase (BAKSI *et. al.*, 2019; POLKO; KIEBER, 2019; TAKADA; CHANDRA; SADDLER, 2019; TAO *et. al.*, 2019; YANG *et. al.*, 2019; YEO *et. al.*, 2019).

A lignina, composto de alta massa molecular, possui uma estrutura amorfa e altamente ramificada com diversos compostos fenólicos que, industrialmente, são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Alguns tratamentos para a recuperação destes compostos no meio a qual estão dispersos, consiste no uso de derivados de petróleo, como o tolueno e benzeno. Estudos evidenciam que tratamentos químicos, físicos e biológicos, podem ser utilizados de modo independente ou associado, se mostrando capazes de aumentar o rendimento e superar os tratamentos que utilizam os derivados do petróleo. Tais tratamentos podem ser utilizados em muitas matrizes, mas são extremamente dependentes da amostra em questão e também do produto final desejado (ASTOLFI *et. al.*, 2015; DOS SANTOS *et. al.*, 2016; LEMÕES *et. al.*, 2018; RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019; SCHNEIDER *et. al.*, 2020; TAKADA; CHANDRA; SADDLER, 2019; VANHOLME *et. al.*, 2019). Tais processamentos buscam viabilizar o uso industrial, de modo a valorizar os compostos aromáticos derivados de matérias-primas lignocelulósicas (RODRIGUEZ *et. al.*, 2021).

Anteriormente foram tratados de alguns compostos de interesse que se faz presente na matriz lignocelulósica e neste capítulo será discutido e apresentado o método de obtenção e os possíveis produtos a serem obtidos para cada matriz.

Os tratamentos realizados sobre as matrizes complexas liberam os compostos fenólicos e outras moléculas, tais como os açúcares redutores. Os compostos fenólicos são obtidos primordialmente de frutos, cascas de árvores, ervas, vegetais e cereais e possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásticas, antibacterianas, antimutagênica e antiproliferativa (ADAMI *et. al.*, 2022; KAUR *et. al.*, 2022; RAUF *et. al.*, 2022; SHARIFI-RAD *et. al.*, 2022; WANG *et. al.*, 2022)..

Estudos apontam que o ácido elágico pode ser incorporado em embalagens bioativas e comestíveis e, possui propriedades específicas como o aumento da viabilidade neuronal, reduzindo os efeitos neurodegenerativos (WANG *et. al.*, 2022; ZHU *et. al.*, 2022). Outro estudo mostrou que a incorporação de ácido vanílico em filmes de quitosana ampliando suas características, como propriedades de barreira e ação anti-microbianas (EELAGER *et. al.*, 2023). Tais características foram observadas na combinação de celulose e naringina, com um aumento no efeito plastificante (GUZMAN-PUYOL *et. al.*, 2022).

Diante a variabilidade matricial apresentada pelos resíduos (obtidos no Capítulo 1) tratamentos químicos e físicos foram propostos para a modificação significativa da matriz, qualificando e quantificando os produtos gerados. O desnovelamento da complexa estrutura lignocelulósica implicará na redução de prováveis interferentes sobre os processos posteriores, como a lignina. Com isso a avaliação dos espectros obtidos proverá um melhor entendimento ante o tratamento aplicado, e com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, observar o impacto do tratamento sobre a estrutura celulósica. Diante tal avaliação fora possível obter o melhor tratamento para todas as matrizes, sem a distinção apresentada entre os resíduos, conferindo a característica de unificação do tratamento. Esta etapa fundamentará o aumento da bioeconomia do processo global utilizado neste trabalho.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

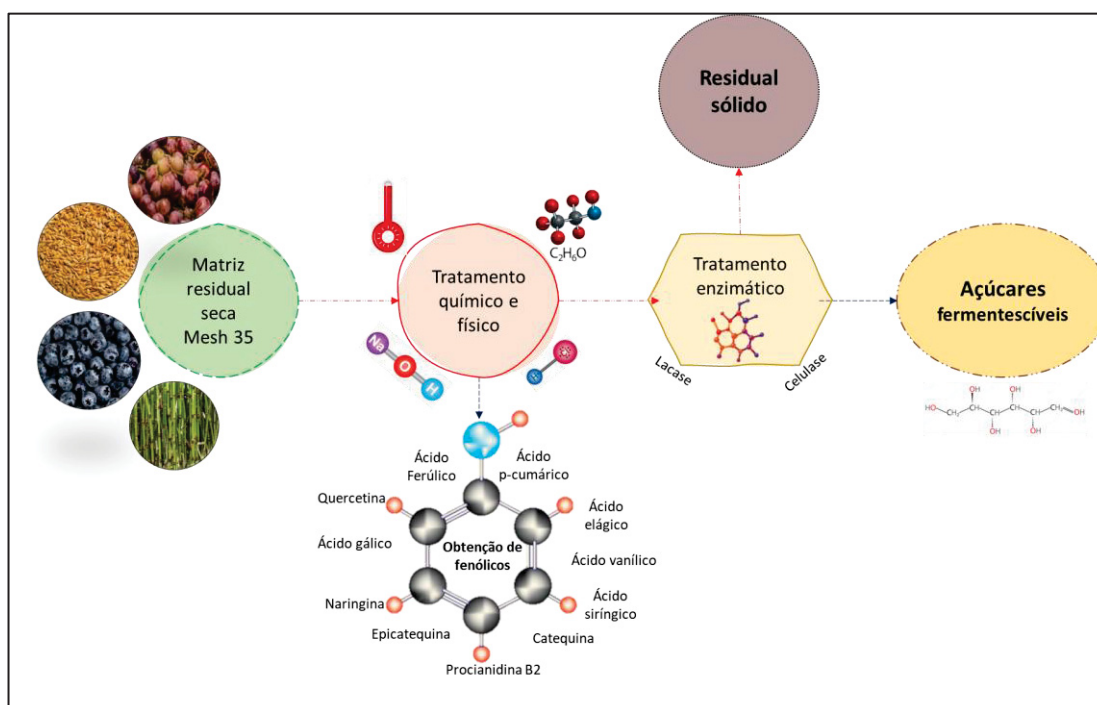
3.2.1. Esquema experimental

O esquema experimental consistiu em interligar o processamento das etapas afim de obter como produtos compostos fenólicos e açúcares fermentescíveis. Deste modo foram utilizadas as matrizes experimentais secas e pré-tratadas fisicamente (Mesh 35 com diâmetro equivalente de 0,5 mm). Sequencialmente as matrizes foram submetidas a:

- Extração de compostos fenólicos (Capítulo 3): tratamentos físicos e químicos foram realizados para se obter uma fração líquida rica em fenólicos e uma fração sólida que foi encaminhada a etapa de sacarificação;
- Sacarificação (Capítulo 4): onde fração sólida obtida após a extração de fenólicos foi submetida à ação enzimática (Lacase e Celulase), para obtenção de açúcares redutores.

Tal esquema global está demonstrado na Figura 8.

Figura 8. Esquema representativo das etapas do processo.



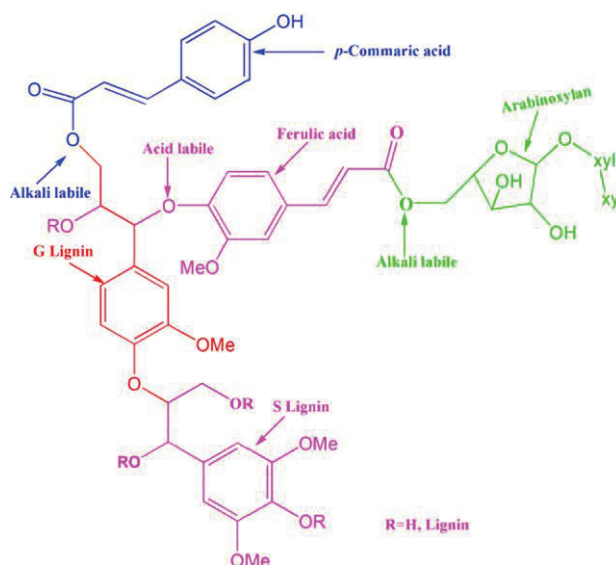
3.2.2. Obtenção de compostos fenólicos

A metodologia aplicada nas matrizes (Casca de arroz, Bagaço de cana de açúcar, Casca de jaboticaba, Bagaço de uva) consistiu na adição de ácido e base, de forma alternada, afim de atingir os sítios lábeis, e liberar compostos como o ácido p-cumárico e o ácido ferúlico (Figura 9), conforme disposto por Li *et. al.* (2020b). Contudo a metodologia foi modificada e adaptada para que grande parte dos compostos fenólicos presentes fossem extraídos, qualificados e quantificados e de forma secundária uma modificação na fração sólida inicial, para que ela fosse utilizada nas etapas posteriores.

Deste modo as amostras foram tratadas de acordo com as seguintes etapas, ilustradas na Figura 10:

- **Reação A** – Adição de 50 mL de NaOH (1M) por grama de amostra e reacionado em banho termostático de 80°C por 24 horas. Após este período a fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A porção líquida foi rotoevaporada e encaminhada para a reação C enquanto a fração sólida foi seca em estufa (50°C por 2 horas) e encaminhada para a reação B;

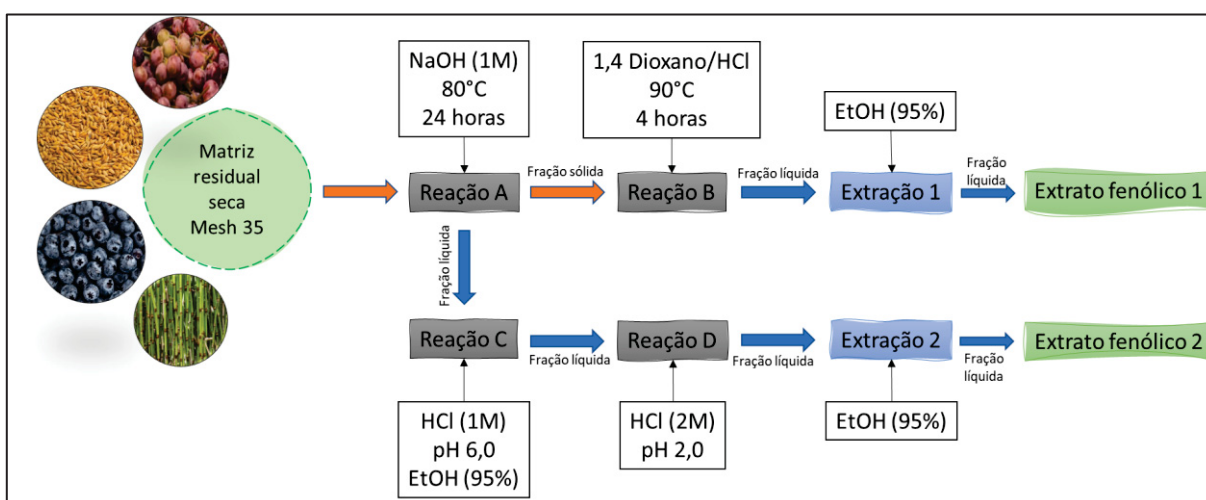
Figura 9. Esquema representativo de uma fração de lignina.



FONTE: ADAPTADO DE (LI *et. al.*, 2020b)

- *Reação B* – Adição de 50 mL de 1,4 Dioxano/HCl (9:1 v/v) por grama de base seca e reacionado em banho termostático a 90°C por 4 horas. Após este período a fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A fração sólida foi lavada por três vezes utilizando 1-4 Dioxano/HCl (1:1 v/v) e seca em estufa (50°C por 2 horas). A porção líquida foi rotoevaporada e encaminhada para a extração A;
- *Extração A* – Adição de 5 mL de EtOH (95%) a cada 15 mL de amostra (porção líquida da reação B). A fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A fração líquida foi submetida a rotoevaporação;
- *Reação C* – Ajuste do pH para 6,0 utilizando HCl (1M). Adição de 6 mL de etanol por grama amostral adicionada na reação A. A fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A fração sólida foi adicionada na reação B e a fração líquida seguiu a reação D, após rotoevaporação;
- *Reação D* – Acidificação para pH 2,0 utilizando HCl (2M). A fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A fração sólida foi adicionada na reação B e a fração líquida seguiu a extração B, após rotoevaporação;

Figura 10. Esquema utilizado na obtenção de fenólicos.



- *Extração B* - Adição de 5 mL de EtOH (95%) a cada 15 mL de amostra (porção líquida da reação D). A fração líquida foi separada da sólida por centrifugação (1400 g por 5 minutos) seguido de filtração (Filtro Whatmann nº 2). A fração líquida foi submetida a rotoevaporação.

3.2.3. Caracterização das frações sólidas e extratos

A caracterização das matrizes foi separada de acordo com as amostras: fração líquida (extrato) e fração sólida.

3.2.3.1. Fração líquida

O meio reacional líquido final foi avaliado quanto a composição de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), aos açúcares redutores pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (SAQIB; WHITNEY, 2011), cromatografia líquida de alta eficiência. Adicionalmente foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada. Tais análises estão descritas abaixo.

a) Quantificação de compostos fenólicos totais

A curva de calibração de ácido gálico foi obtida no intervalo de concentração de 45 a 450 mg L⁻¹. Em balões volumétricos de 10 mL, as amostras foram preparadas pipetando 5 mL de água destilada (100 µL de solução diluída de ácido gálico) então adicionou-se 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Foi mantido em repouso por 3 minutos e adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de cálcio a 15 %. Os balões foram agitados e as soluções avolumadas e homogeneizadas. As amostras foram alocadas ao abrigo da luz por 2 horas e seguidamente mensuradas as absorbâncias em espectrofotômetro a 765 nm. As amostras dos sobrenadantes filtrados provenientes dos tratamentos foram utilizadas em volumes idênticos aos dos reagentes, substituindo apenas o volume de solução de ácido gálico pelo amostral.

Com isso, as soluções foram alocadas igualmente por 2 horas na ausência de luz e suas absorvâncias lidas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 765 nm. As unidades para essa análise são expressas em miligrama equivalente de ácido gálico por grama em base seca (mg EAG g⁻¹ BS).

b) Quantificação de açúcares redutores

Consistiu em três etapas: (1) Preparo do reagente DNS: Em um béquer de 1 L, foi adicionado 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g de tartarato sódio e potássio em 800 mL de hidróxido de sódio 0,5 M, sob agitação magnética e leve aquecimento. Após a solubilização dos sólidos, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e avolumada com água destilada; (2) Obtenção da curva padrão: A curva padrão foi obtida utilizando concentrações conhecidas de açúcares redutores, dentro de um intervalo específico de concentração relacionada com a absorvância da amostra após a reação com o reagente anteriormente preparado; (3) Análise das amostras: Amostras com alta concentração de açúcares foram diluídas a fim de adequá-las a curva padrão anteriormente obtida, sendo necessário corrigir o valor obtido para o valor real amostral, multiplicando pela diluição realizada. Com isso a mistura de 1 mL de amostra para 4 mL do reagente DNS foi agitada em vórtex por 30 segundos, seguido pela alocação destes em banho-maria com temperatura da água no estado em ebulição ao longo de 5 minutos. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Após o resfriamento a leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) foi executada em cromatógrafo Shimadzu Prominence com detector de arranjo de diodos. A análise foi separada em três mix. O Mix 1 compreendeu à catequina, cianidina 3-cloreto de glucosídeo e procianidina B2, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de acetonitrila, metanol e ácido fosfórico (0,1% em água) ao longo de 45 minutos. O Mix 2 compreendeu ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico,

epicatequina, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, Naringina e ácido trans-cinâmico, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de acetonitrila e ácido acético (pH 3,07) ao longo de 70 minutos. E um Mix 3 a fim de quantificar a Quercetina 3/isoquercetina, ácido elágico e Quercetina, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de metanol e ácido fosfórico (0,1% em água) ao longo de 38 minutos.

Todos os padrões utilizados para a obtenção das curvas padrão, possuem alto grau de pureza e são da marca Sigma-Aldrich (São Paulo/SP). Os reagentes líquidos são de padrão cromatográfico e adquiridos da empresa Êxodo Científica (Sumaré/SP).

d) Espectroscopia (MIR-ATR)

A análise ocorreu de modo a avaliar a intensidade e/ou possíveis deslocamentos de bandas correspondentes ante aos compostos de interesse, lignina, hemicelulose e celulose. Foi utilizado um espectrômetro (Bruker, Vertex 70) equipado com cristal carbono, em uma temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com acessório de refletância total atenuada (MIR-ATR) na faixa espectral de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 4 cm^{-1} . A análise das amostras foi conduzida no Laboratório de FTIR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a análise das bandas correspondentes foi utilizada a Tabela 6.

3.2.3.2. Fração sólida

A fração sólida final de cada amostra foi avaliada quanto ao percentual de lignina (método do brometo de acetila), método gravimétrico (massa), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada e microscopia eletrônica de varredura em sua porção retida (sólidos). As metodologias das análises citadas são apresentadas abaixo:

a) Percentual de lignina (Brometo de acetila)

Análise espectrofotométrica de lignina em brometo de acetila – método descrito por Moreira-Vilar *et. al.* (2014): Foi utilizado 20 mg de amostra e 0,5 mL de 25% de brometo de acetila (v/v em ácido acético glacial) e incubado a 70°C por 30 minutos. Posteriormente foi resfriado e adicionado 0,9 mL de NaOH (2M), 0,1 mL de hidroxalamina-HCl (5M) e completado o volume de cobertura amostral utilizando ácido acético glacial (4-6 mL). A amostra tratada foi centrifugada (1400 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante utilizado para leitura de absorbância a 280 nm. O equipamento utilizado para leitura de absorbância foi BEL Photonics (UV-M51) com cubetas de Quartzo. A curva padrão foi constituída por aumento da concentração de lignina pura (95% de pureza – Sigma Aldrich) e esta demonstrada no APÊNDICE 1. Tal análise se refere quanto a obtenção de metabólitos secundários com propriedades específicas da planta, como ceras, taninos, óleos e resinas, por isso a importância desta etapa.

b) Espectroscopia (MIR-ATR)

Foi utilizado um espectrômetro (Bruker, Vertex 70) equipado com cristal carbono, em uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com acessório de refletância total atenuada (MIR-ATR) na faixa espectral de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 4 cm^{-1} . A análise das quatro amostras foi conduzida no Laboratório de FTIR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A análise ocorreu de modo a avaliar a intensidade e/ou possíveis deslocamentos de bandas correspondentes ante aos compostos de interesse, lignina, hemicelulose e celulose. Para a análise das bandas correspondentes foi utilizada a Tabela 6.

c) Massa (Método gravimétrico)

O método gravimétrico avaliou a perda de massa da amostra ao longo do tratamento. Deste modo, o método consistiu em subtrair da massa inicial a massa final obtida ao fim da reação ou procedimento em questão. Tal diferença resultante é a massa perdida no processo ou procedimento realizado. Neste caso foi utilizada a balança analítica para a mensuração.

d) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da superfície foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR). As micropartículas foram fixadas em suporte de alumínio e submetidas à metalização com ouro sob vácuo (SCD-030). Para visualização das amostras, foram utilizados aumentos de 1000 e 5000x, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Tescan, Vega 3, Kohoutovice, República Tcheca) com potencial de aceleração de 15 kV.

3.2.4. Análises estatísticas

3.2.4.1. Teste de Tukey

O Teste de Tukey é utilizado para avaliar semelhanças e diferenças de valores obtidos quanto a concentrações, percentuais e outras análises. Tal teste executa a comparação das médias, partindo de dados oriundos da análise de variância (ANOVA). Este utiliza o teste F para a análise da diferença mínima significativa (DMS) entre amostras, com uma amplitude estudentizada, quadrado médio dos resíduos da anova e tamanho amostral dos grupos. Porém, não avalia diferenças entre tratamentos, mas sim entre os grupos dentro do mesmo tratamento (ABDI; WILLIAMS, 2010). O teste foi executado utilizando o software Microsoft Excel (2022).

3.2.4.2. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA), foi aplicada utilizando o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

Primeiramente, os dados (espectros são mais utilizados) são organizados no formato de uma matriz X. Para tanto, cada linha da matriz X contém um grande grupo de dados enquanto cada coluna da matriz X apresenta as informações das variáveis nos diferentes aspectos analisados. O princípio da PCA consiste em decompor a

matriz X em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (T) e outra chamada de *loadings* (PT) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). A matriz de *scores* carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz X , enquanto os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de X . Os resultados da decomposição da matriz X em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA *et. al.*, 2016).

3.2.4.3. Análise hierárquica de clusters (Hierarchical Cluster Analysis - HCA)

A HCA é uma análise de agrupamentos utilizada para unir amostras semelhantes e classificá-las de acordo com suas características únicas. O software utilizado para esta análise foi o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

A análise consiste basicamente em determinar a proximidade (distâncias) entre os dados e assim definir suas similaridades ou diferenças. Tal análise utilizou duas ferramentas para a obtenção dos resultados: (1) o método de Ward: técnica hierárquica de partições que consiste em determinar, com auxílio de algoritmo computacional, uma combinação dos dados vetoriais de modo a reduzir a variação interna dos dados, com a presença de sistemas do tipo centroides; (2) a distância Euclidiana: mais popular entre as métricas utilizadas, produzem, utilizando a iteração entre dois pontos, uma distância vetorial, similar ao de componentes principais, conforme descrito no item anterior (CARTER; MORRIS; BLASHFIELD, 1989; GHENDOV-MOSANU *et. al.*, 2022a; LANDAU; CHIS TER, 2010).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram avaliadas quanto as suas características físicas e químicas. Deste modo a fração líquida foi avaliada após o tratamento inicial (Reação A) e em sua composição final (extratos fenólicos 1 e 2). A fração sólida foi avaliada mediante os processos com recuperação em massa (após as reações A e B) e as recuperadas posteriores a obtenção do extrato fenólico 2 (linha de purificação inferior da Figura 10).

3.3.1. Avaliação da fração líquida

A fração líquida foi avaliada quanto fenólicos totais (produto de interesse deste processo), açúcares redutores, espectros (MIR-ATR) e em relação a constituição fenólica individual por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise dos extratos fenólicos 1 e 2 (Tabela 9) evidenciou que o extrato fenólico 2, obtido após a reação A (tratamento alcalino com temperatura), foi mais eficiente na extração, quando comparada aos tratamentos para a obtenção do extrato fenólico 1 (após a reação ácida). Foi observado um aumento da concentração dos compostos fenólicos para a casca de jaboticaba ($244,3 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$), bagaço de cana ($204,54 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$) e casca de arroz ($120,66 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$), enquanto o obtido nas mesmas reações para o bagaço de uva apresentou manutenção de tais compostos (manutenção de $639,74 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$ quando considerado o desvio padrão do obtido para o extrato fenólico 2).

O extrato fenólico 1, obtido após a reação B (reação ácida) e sua purificação, demonstrou uma concentração fenólica média de $580,23 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$ (Tabela 9), porém nota-se um aumento de açúcares redutores (Tabela 10) no extrato fenólico 1, em média $10,71 \text{ g L}^{-1}$, enquanto o extrato fenólico 2 apresentou uma média de $6,16 \text{ g L}^{-1}$. Tal evidência demonstra que a ação do tratamento ácido sobre a matriz é de maior impacto na porção celulósica, que é o objeto estudado nas próximas etapas.

Tabela 9. Compostos fenólicos totais em mg de ácido gálico equivalentes por grama em base seca (mg EAG g⁻¹ BS).

	Após reação A*	Extrato fenólico 1**	Extrato fenólico 2***
Bagaço de uva	639,74 ^a ±17,14	633,36 ^a ±9,72	613,23 ^a ±22,66
Casca de arroz	497,12 ^b ±1,92	500,48 ^b ±83,91	617,78 ^a ±55,99
Casca de jaboticaba	277,89 ^d ±1,56	415,49 ^c ±6,03	522,19 ^b ±14,88
Bagaço de cana	363,18 ^c ±18,24	525,78 ^b ±10,93	567,72 ^b ±45,41

NOTA: *Tratamento alcalino; **Tratamento da fração sólida após reação A; ***Tratamento da fração líquida após reação A.

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Com isso foi executado o teste de Tukey para avaliação das semelhanças e diferenças reacionais. Tal teste demonstrou semelhança significativa (nível de significância 5%) para as amostras bagaço de uva, casca de arroz e bagaço de cana e diferença significativa para a casca de jaboticaba na avaliação dos extratos fenólicos 1 e 2. Comparando as amostras após a reação A e o extrato fenólico 2 (o extrato fenólico 2 é a sequência de tratamentos após a reação A), observa-se similaridade quanto às amostras bagaço de uva e casca de arroz, enquanto para a casca de jaboticaba e o bagaço de cana nota-se diferença significativa a 5% de nível de significância. Deste modo pode-se concluir que o tratamento de todas as matrizes na reação B, foi capaz de gerar compostos fenólicos mediante a combinação ácido/temperatura sobre os sítios lábeis. Isso foi observado com a ação do binômio álcali/temperatura.

Li et. al (2020c) comparou diferentes métodos na obtenção de compostos fenólicos em resíduos de maçã e obteve após as ações diretas de ácido e base 5,55 mg EAG g⁻¹ BS e 10,62 mg EAG g⁻¹ BS, respectivamente. Tal estudo evidenciou maior eficiência na obtenção de fenólicos via reação álcali, obtendo compostos como ácido 4-hidrobencóico, quercetina-3-O-galactosídeo e floridizina. Além disso, a reação ácida demonstrou potencial na obtenção de ácido 4-hidroxibenzóico e ácido iso-ferúlico, por exemplo. Os valores diferem dos obtidos em nosso experimento pelas características específicas da matriz processada e do tratamento realizado sobre ela, contudo evidencia o mesmo obtido por nós, ou seja, a maior eficiência de obtenção dos fenólicos via reação alcalina.

Além da obtenção de compostos fenólicos, os tratamentos agem sobre a matriz de modo geral, atingindo também compostos como a celulose e hemicelulose. Deste modo, a determinação dos açúcares redutores faz-se necessária (Tabela 10). As análises demonstraram que a ação reacional em B resultou em uma quantidade superior de açúcares redutores, devido a fragilização da matriz após a reação A. Em todos os casos (Casca de arroz, bagaço de cana, casca de jaboticaba e bagaço de uva) a quantidade de açúcares redutores foi superior no extrato fenólico 1, quando comparado tanto com o extrato fenólico 2 quanto após a reação A, evidenciando uma maior reação deste tratamento ante a celulose.

Aplicando o teste de Tukey sobre os dados de açúcares redutores ante a mesma matriz (em relação aos dados na mesma linha) nota-se que a nível de significância de 5% há uma diferença da linha processual inferior (após reação A e extrato fenólico 2) com o tratamento posterior à reação B (Extrato fenólico 1). Com isso a obtenção de fenólicos pode afetar diretamente a produção de açúcares redutores na próxima etapa a ser executada (Capítulo 4), o que é primordial para a criação de uma linha processual em um sistema de biorrefinaria.

Zhong *et. al.* (2021) evidenciou que o tratamento utilizando NaOH (2% m/v) aumentou o rendimento na obtenção de glicose com um pré-tratamento a 80°C ao longo de 1,5h em 97,7% na hidrólise enzimática realizada sequencialmente ao uso do álcali. Além deste aumento de rendimento, os fenólicos recuperados apresentaram baixo peso molecular, alta estabilidade térmica e poucos açúcares ligados.

Tabela 10. Açúcares redutores (g L⁻¹) obtidos após os tratamentos químicos e físicos.

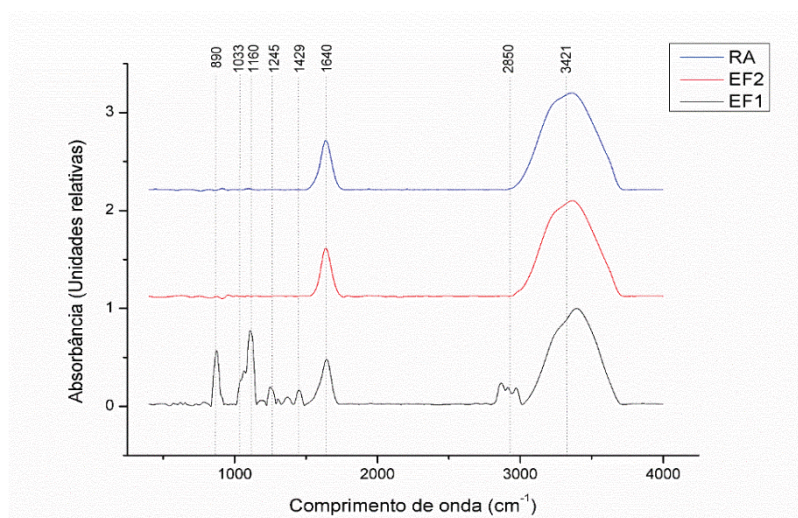
	Após reação A*	Extrato fenólico 1**	Extrato fenólico 2***
Bagaço de uva	6,25 ^b ±1,15	10,66 ^a ±0,27	7,86 ^b ±0,40
Casca de arroz	2,49 ^c ±0,15	10,73 ^a ±0,36	2,35 ^d ±0,12
Casca de jaboticaba	6,71 ^a ±0,04	9,96 ^a ±0,07	9,11 ^a ±0,11
Bagaço de cana	2,46 ^c ±0,03	11,47 ^a ±0,01	5,31 ^c ±0,14

NOTA: *Tratamento alcalino; **Tratamento da fração sólida após reação A; ***Tratamento da fração líquida após reação A.

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por amostra em questão (linhas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

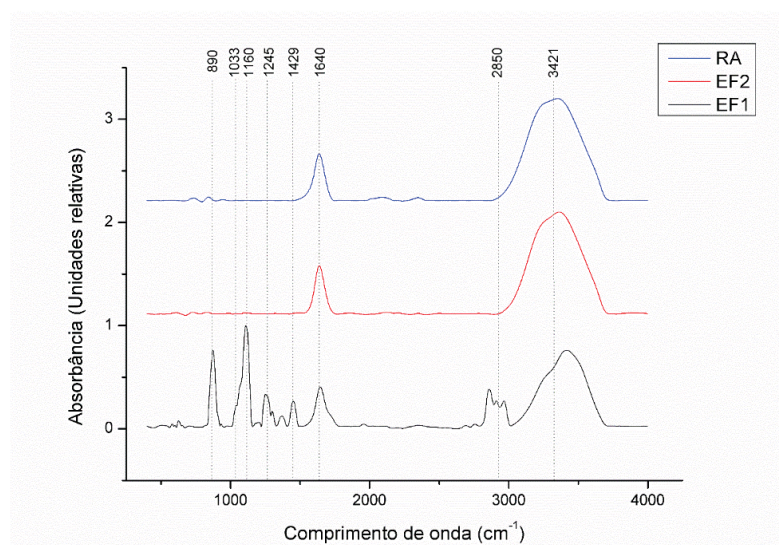
Os dados espectrais demonstram diferenças nítidas entre as reações ao longo de EF1 (Extrato fenólico 1) e EF2 (Extrato fenólico 2), contudo não se nota diferença entre as amostras e nem entre as frações RA (Reação alcalina) e EF2. Deste modo, uma análise multivariada com auxílio de parâmetros estatísticos foi realizada. Em nosso caso, o HCA foi aplicado para detectar as semelhanças e diferenças entre as amostras e seus respectivos extratos (Figuras 11 a 14). Tais resultados estatísticos estão demonstrados na Figura 15.

Figura 11. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento da casca de arroz.



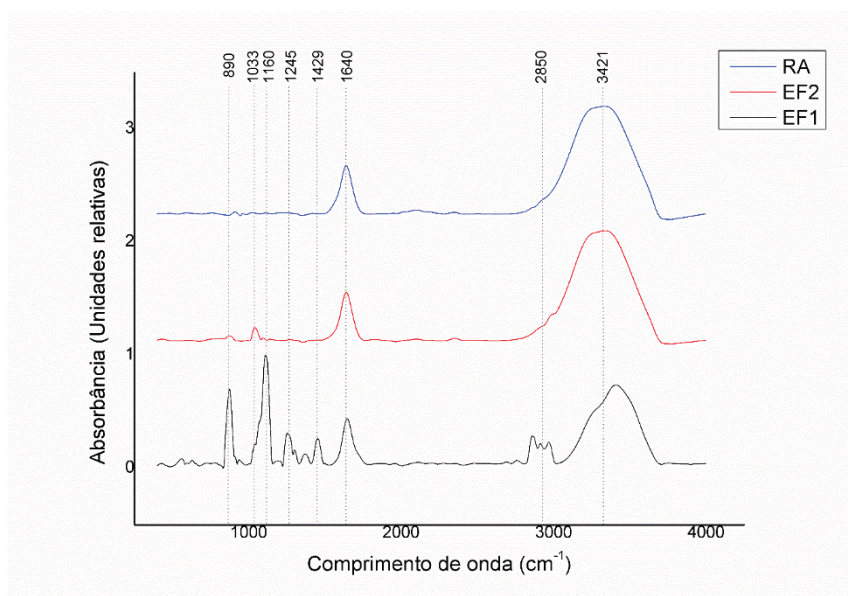
LEGENDA: EF1-Extrato fenólico 1; EF2 – Extrato fenólico 2; RA – Extrato líquido obtido na reação A.

Figura 12. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento do bagaço de cana.



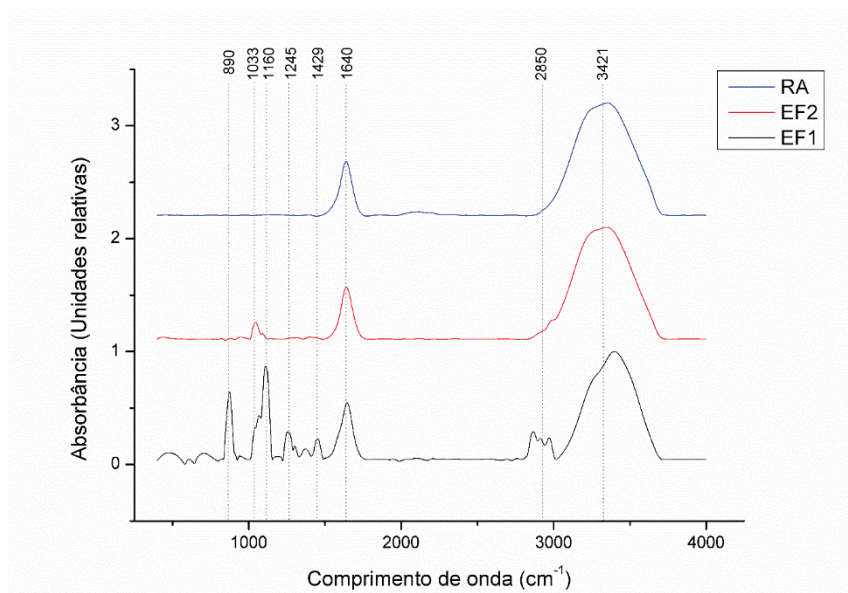
LEGENDA: EF1-Extrato fenólico 1; EF2 – Extrato fenólico 2; RA – Extrato líquido obtido na reação A.

Figura 13. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento da casca de jaboticaba.



LEGENDA: EF1-Extrato fenólico 1; EF2 – Extrato fenólico 2; RA – Extrato líquido obtido na reação A.

Figura 14. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento do bagaço de uva.

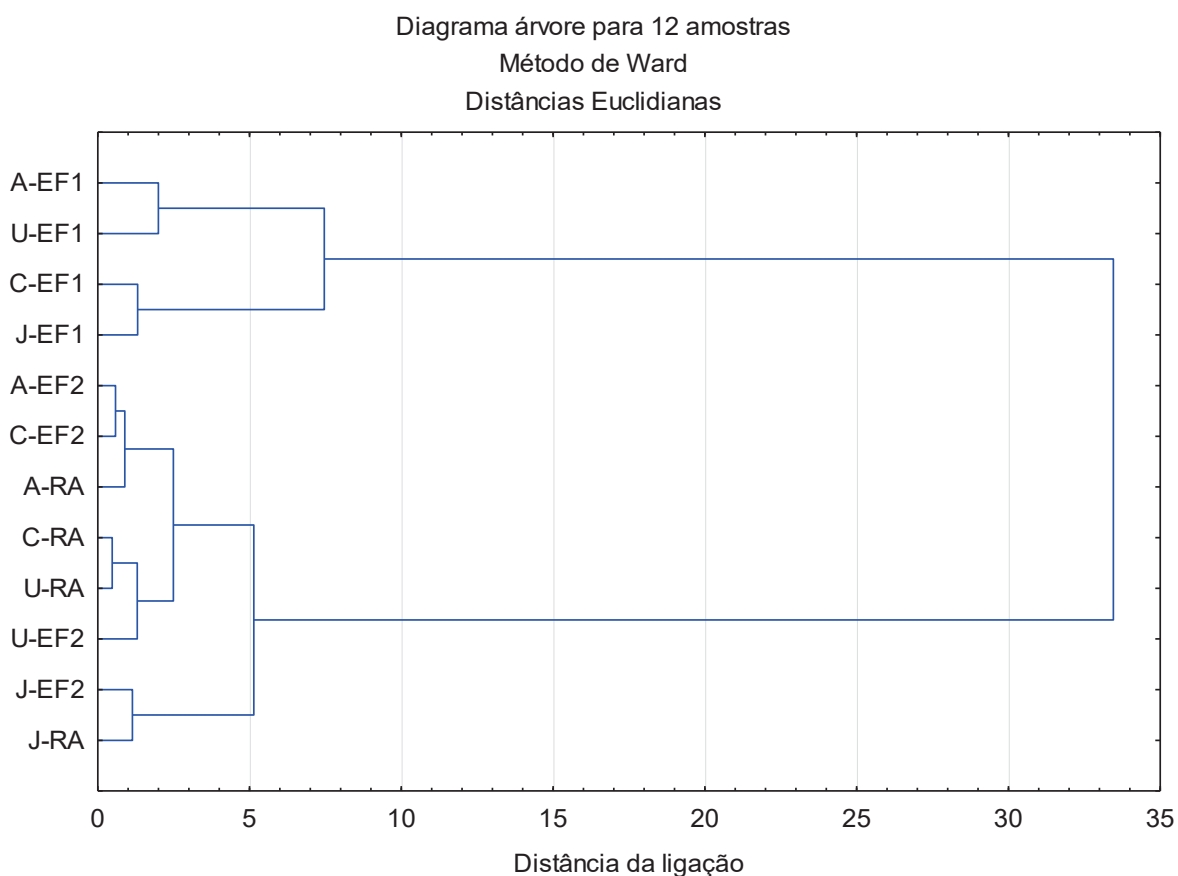


LEGENDA: EF1-Extrato fenólico 1; EF2 – Extrato fenólico 2; RA – Extrato líquido obtido na reação A.

Analisando a Figura 15 é possível verificar que as reações para obtenção do extrato fenólico 1, em todas as matrizes, se diferem dos extratos obtidos após a reação A e as reações para a obtenção do extrato fenólico 2. Contudo, para os extratos obtidos após a reação A e ao longo do processo para obtenção do extrato fenólico 2

não é possível evidenciar quaisquer diferenças para os casos estudados. Comparando os resultados das análises anteriores, podemos notar que, a reação ácida foi capaz de liberar compostos diferentes quando comparado aos pós reação álcali, inclusive disponibilização não ideal de açúcares fermentescíveis, que deveria ocorrer na próxima etapa (Capítulo 4).

Figura 15. Dendrograma para avaliação dos espectros obtidos das amostras líquidas.



LEGENDA: U: Bagaço de uva; J: Casca de jaboticaba; C: Bagaço de cana; A: Casca de arroz. EF1: Extrato fenólico 1; EF2: Extrato fenólico 2; RA: Extrato líquido obtido na reação A.

O HCA evidenciou que os espectros obtidos se diferenciam significativamente entre si (principalmente os extratos fenólicos 1 das demais frações para todas as matrizes). Portanto, uma análise específica para os compostos fenólicos se faz necessária, uma vez que a banda referente à lignina se manteve em todos os casos (1640 e 3421 cm^{-1}).

A cromatografia líquida vem explicitar quais os produtos gerados nesta diferenciação evidenciada pelo HCA. Com isso para avaliar e quantificar os compostos

fenólicos liberados, foi realizado a cromatografia líquida (HPLC) sobre as amostras obtidas após a reação A e dos extratos fenólicos 1 e 2 (Tabela 11). Observa-se que as maiores concentrações de fenólicos são observadas após a reação A e extratos fenólicos 1, tendo grande variância entre as matrizes analisadas. A reação A, conforme demonstrado por Li *et. al.* (2020), age nos sítios álcali-lábeis, enquanto o extrato fenólico 1 é obtido após a ação sobre os sítios ácido-lábeis. Com isso uma análise aprofundada dos dados se fez necessária, a fim de avaliar e correlacionar os dados obtidos.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada sobre os dados auto escalados por variáveis, minimizando possíveis erros e demonstrar o real impacto de seus componentes principais, sem que haja iterações dos valores reais com os autovalores obtidos. Os dados foram analisados quanto aos impactos da variância dos dados, sendo observado uma distribuição aleatória dos erros ao longo das variáveis analisadas. Os cinco componentes principais adotados equivalem a 85,81% da variância dos dados. Avaliando as diversas combinações de componentes principais, os PC's 1, 2 e 4 não explicitou qualquer correlação entre elas. Os PC's 3 e 5 demonstraram semelhanças em relação a variância das amostras, sendo possível uma agrupar os resultados obtidos das amostras 1, 4, 7 e 10 (PC3 positivo e PC5 negativo). A combinação das amostras relaciona que o tratamento alcalino apresentou similaridade quanto a obtenção de produtos específicos (avaliando os *loadings* na Figura 28), devido a influência em PC3 das variáveis 2 (Ácido elágico), 4 (Ácido gálico) e 6 (Ácido vanílico) com as variáveis em PC5 de 10 (ácido p-cumárico) e 11 (Ácido ferúlico). Consequentemente, é possível afirmar que utilizando o tratamento alcalino associado à temperatura teores similares de componentes fenólicos podem ser obtidos, como o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, são obtidos para todos os casos estudados (Casca de arroz, Bagaço de cana, Casca de jaboticaba e Bagaço de uva).

Tabela 11. Análise de cromatografia líquida da composição de compostos fenólicos (mg L⁻¹) presentes nas frações resultantes das reações químicas e físicas, obtida pela análise utilizando HPLC.

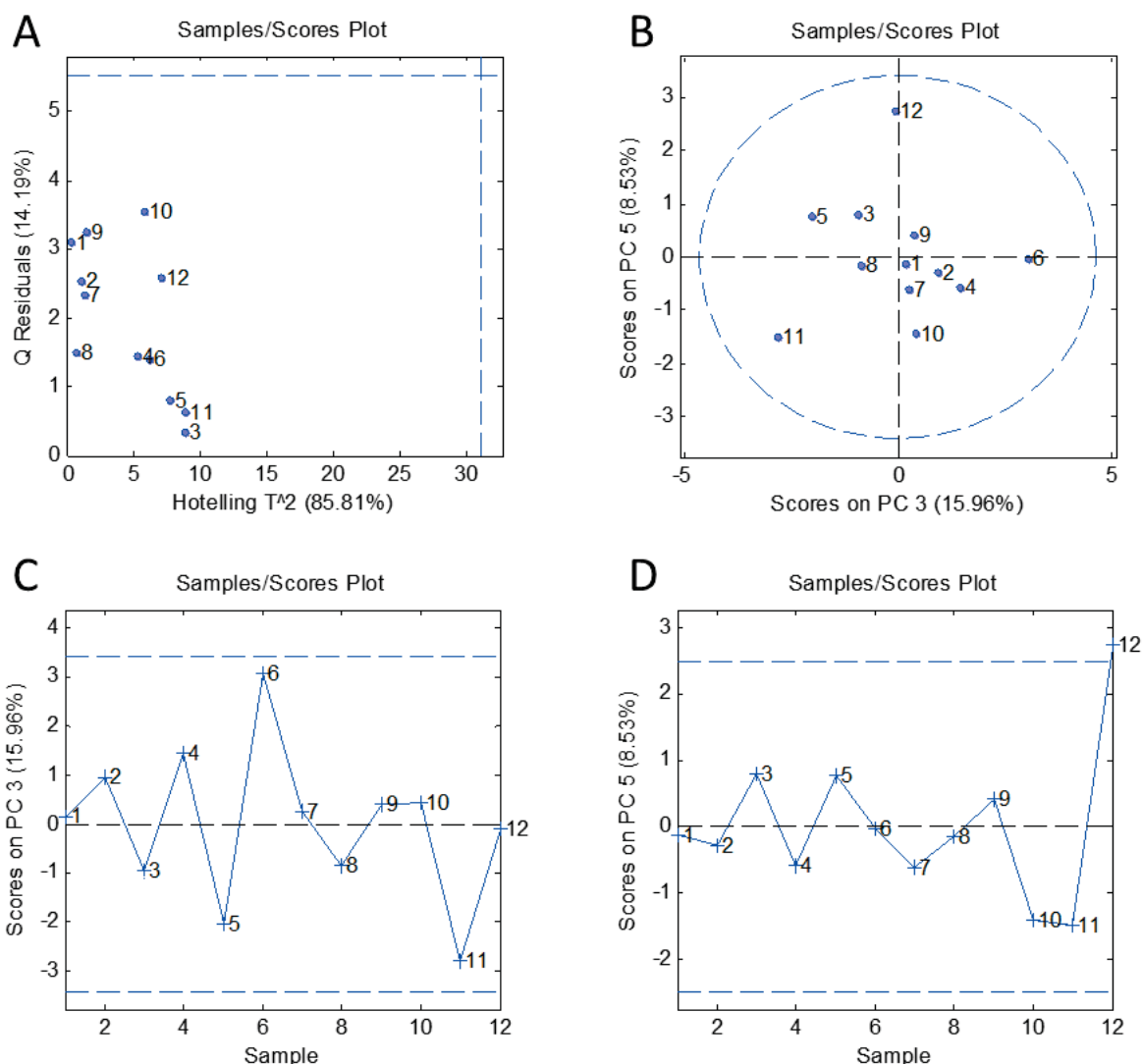
Matriz	Número da amostra	Amostra	Quercetina 3	Ácido Elágico	Quercetina	Ácido Gálico	Ácido clorogênico	Ácido vanílico	Ácido caféico	Epicatequina	Ácido siríngico	Ácido p-cumarico	Ácido ferúlico	Naringina	Ácido trans-cinâmico	Catequina	Procianidina B2	Cianidina
Código da variável	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Bagaço de uva	1	Reação A*	0,81	≤LQ	≤LQ	3,63	0,54	5,09	2,60	13,01	8,69	9,32	6,11	3,44	≤LQ	≤LQ	11,51	≤LQ
	2	Extrato fenólico 2**	10,00	36,90	≤LQ	≤LQ	≤LQ	4,72	0,98	11,03	4,66	14,28	2,42	≤LQ	≤LQ	≤LQ	5,35	≤LQ
	3	Extrato fenólico 1***	≤LQ	6,29	≤LQ	211,86	0,94	10,71	4,84	16,90	11,40	7,96	5,59	2,16	2,02	6,01	97,25	≤LQ
Casca de arroz	4	Reação A*	83,19	51,93	≤LQ	6,48	≤LQ	3,30	2,19	0,77	36,94	149,88	81,65	12,15	≤LQ	2,64	≤LQ	≤LQ
	5	Extrato fenólico 2**	≤LQ	≤LQ	≤LQ	≤LQ	≤LQ	6,24	≤LQ	1,47	52,25	223,49	34,65	9,54	≤LQ	8,64	≤LQ	≤LQ
	6	Extrato fenólico 1***	61,83	74,63	≤LQ	38,41	≤LQ	6,52	8,52	1,77	8,39	45,70	46,20	3,28	0,65	3,07	55,87	≤LQ
Casca de jaboticaba	7	Reação A*	1,35	0,67	≤LQ	≤LQ	≤LQ	11,20	LQ	3,97	3,37	0,27	3,12	2,11	≤LQ	0,32	≤LQ	≤LQ
	8	Extrato fenólico 2**	1,20	0,60	≤LQ	2,45	1,23	3,67	0,28	2,58	9,53	4,98	22,20	1,51	1,34	4,14	≤LQ	≤LQ
	9	Extrato fenólico 1***	1,27	0,63	≤LQ	≤LQ	0,23	0,58	0,27	1,64	1,59	1,01	0,35	0,25	0,11	0,34	25,69	≤LQ
Bagaço de Cana	10	Reação A*	9,74	4,87	≤LQ	≤LQ	5,20	14,58	≤LQ	6,82	2,32	7,50	≤LQ	≤LQ	≤LQ	0,43	≤LQ	≤LQ
	11	Extrato fenólico 2**	13,73	6,86	≤LQ	3,52	≤LQ	3,55	0,47	11,45	27,23	1,82	151,1	2,26	4,01	5,94	11,10	≤LQ
	12	Extrato fenólico 1***	15,34	7,67	3,83	≤LQ	1,37	2,04	1,41	4,81	19,05	2,23	0,17	LQ	0,14	3,64	6,16	≤LQ

NOTA: * Tratamento alcalino, ** Tratamento da fração líquida após reação A; *** Tratamento da fração sólida após reação A.

LEGENDA: ≤LQ – Valores inferiores ao limite de quantificação da curva padrão.

Além disso, foi possível avaliar a ação dos tratamentos em relação a mesma matriz, correlacionando os *loadings* e *scores* (Figuras 16 e 17) obtidos: **(1)** Para o caso do bagaço de uva, é observada a distinção de dois grupos. O primeiro se refere às amostras 1 e 2, enquanto o outro se refere a amostra 3. As amostras 1 e 2 se assemelham na combinação da porção positiva de PC3 (alta significância das variáveis 1, 2 e 7) e negativa de PC5 (alta significância das variáveis 6 e 11). A amostra 3 se destaca na combinação da porção negativa de PC3 (alta significância das variáveis 13 e 14) e positiva de PC5 (alta significância da variável 3). Nota-se que o extrato fenólico 1 se diferencia das demais amostras devido à presença das variáveis 13 (ácido trans-cinâmico) e 14 (catequina) não observada nas amostras 1 e 2 (fração obtida após a Reação A). Com isso, avaliando a amostra 1 e 2 temos uma variação positiva da variável 2 (ácido elágico), previamente não detectado na amostra da Reação A e sendo detectada no extrato fenólico 2. Além disso, é possível concluir analisando os dados cromatográficos que a ação sequenciada de álcali e ácido sobre a matriz liberou elevadas concentrações de ácido gálico $211,86 \text{ g L}^{-1}$; **(2)** Para o caso da casca de arroz, é observada a distinção das três amostras (4, 5 e 6) quanto aos componentes principais. A amostra 4 e 6 estão na porção positiva de PC3 e negativa de PC5 enquanto a amostra 5 está no quadrante oposto (PC3 negativo e PC5 positivo). As amostras 4 e 6 se distinguem pelo aumento de PC3, principalmente descritos pelas variáveis 2 (ácido elágico) e 7 (ácido cafeico), observado um aumento das concentrações destas, mas ainda sendo semelhante às outras variáveis correlacionadas neste componente principal. Para as amostras 4 e 5 se diferenciam significativamente quanto aos PC's 3 e 5 quanto às variáveis 8 (epicatequina) e 9 (ácido sirínico), observado um aumento da concentração de ambos os componentes, de modo significativo; **(3)** Para o caso da casca de jaboticaba é observada a distinção das três amostras (7, 8 e 9) quanto aos componentes principais. A amostra 7 encontra-se na porção positiva de PC3 e negativa de PC5, a amostra 8 na porção negativa de ambos os componentes principais (PC3 e PC5) enquanto a amostra 9 está no quadrante oposto (PC3 positivo e PC5 positivo). Avaliando as amostras 7 e 8 é observado uma variação quanto a posição em PC3 (da porção positiva para a negativa deste componente principal). Esse fato se deve pela significância das variáveis 13 e 14 (ácido trans-cinâmico e catequina, respectivamente) para tal componente principal, onde observando os dados do HPLC é observado um aumento da concentração de tais compostos;

Figura 16. Distribuição aleatória dos dados e análise de componentes principais quanto aos dados obtidos via HPLC.

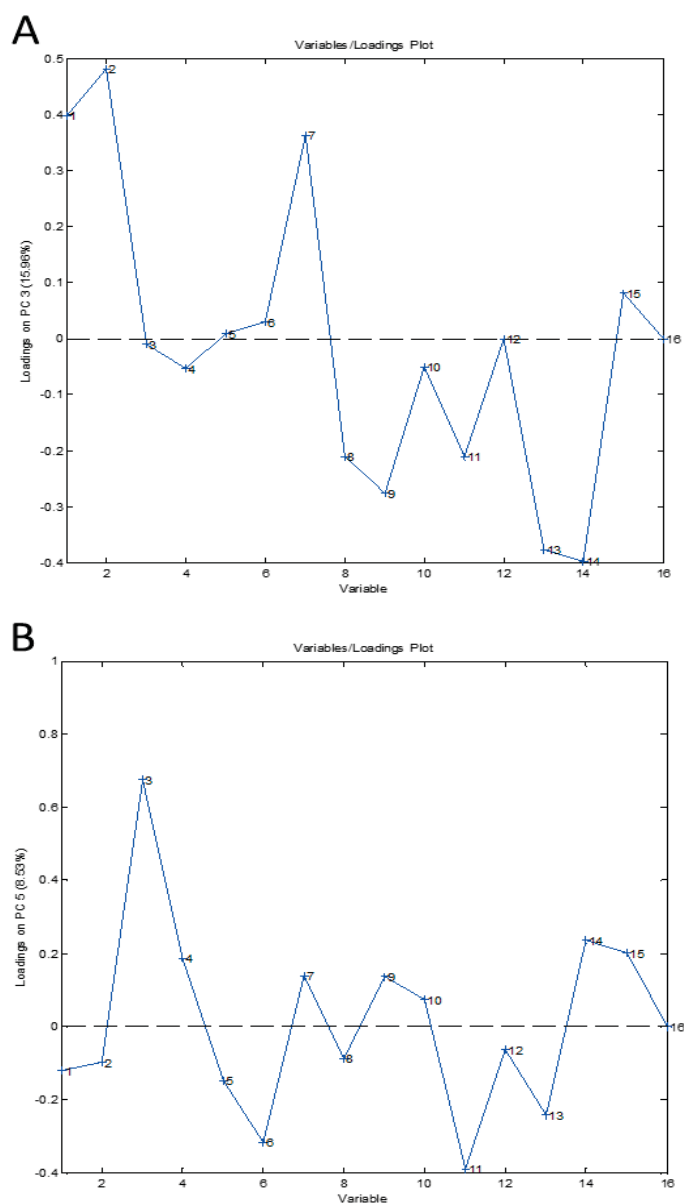


LEGENDA: 1, 2 e 3 correspondem ao bagaço de uva, sendo a inicial, extrato fenólico 2 e extrato fenólico 1, respectivamente; 4, 5 e 6 correspondem a casca de arroz, sendo a inicial, extrato fenólico 2 e extrato fenólico 1, respectivamente; 7, 8 e 9 correspondem à casca de jaboticaba, sendo a inicial, extrato fenólico 2 e extrato fenólico 1, respectivamente; 10, 11 e 12 correspondem ao bagaço de cana, sendo a inicial, extrato fenólico 2 e extrato fenólico 1, respectivamente.

(4) Para o caso do bagaço de cana é observada a distinção das três amostras (10, 11 e 12) quanto aos PC's 3 e 5. A amostra 10 se faz na porção positiva de PC3 e negativa de PC5, a amostra 11 na porção negativa de ambos os componentes principais (PC3 e PC5) enquanto a amostra 12 está no quadrante oposto (PC3 positivo e PC5 positivo). Avaliando as diferenças entre as amostras 10 e 11 quanto a PC3 podemos observar a influência da variável 11 (ácido ferúlico), que ao avaliar os dados cromatográficos, nota-se um aumento significativo da concentração deste fenólico.

Contudo ao avaliar as diferenças entre os extratos 2 e 1, podemos observar uma variação significativa na mudança de quadrante em PC5 (da porção negativa para a positiva). Tal fato é explicado pela variância de 3 (quercetina), que ao avaliar os dados cromatográficos se observa a presença deste componente apenas nesta amostra.

Figura 17. Análise de *loadings* de cada componente principal ao longo das variáveis analisadas.



LEGENDA: (1) Quercetina 3; (2) Ácido elágico; (3) Quercetina; (4) Ácido gálico; (5) Ácido clorogênico; (6) Ácido vanílico; (7) Ácido cafeico; (8) Epicatequina; (9) Ácido siríngico; (10) Ácido p-cumárico; (11) Ácido ferúlico; (12) Naringina; (13) Ácido trans-cinâmico; (14) Catequina; (15) Procianidina B2; (16) Cianidina.

3.3.2. Avaliação da fração sólida

A fração sólida foi avaliada quanto a massa perdida ao longo do processo, percentual de lignina presente no residual após a filtração, espectros (MIR-ATR) e microscopia eletrônica de varredura.

A massa perdida reflete a efetividade de conversão de fração de lignocelulósica que foi transformada e liberada ao meio líquido após cada reação ou extração. Na Tabela 12 são apresentados os dados referentes a massa perdida ao longo do processo de acordo com a reação e avaliada utilizando o teste de Tukey. Na reação A, nota-se uma diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$), com maior perda mássica para o bagaço de uva e a casca de jaboticaba, demonstrando assim alta susceptibilidade sobre a reação alcalina em associação com a temperatura.

Tabela 12. Massa perdida (gramas a cada 100 gramas de amostra) ao longo do processamento das matrizes (Método gravimétrico).

	Após reação A*	Após reação B**	Após extração 1*****	Após reação C***	Após reação D**** e extração 2*****	Total
Casca de arroz	36,56 ^c ±2,24	25,95 ^b ±1,33	5,36 ^a ±0,26	1,58 ^a ±0,13	0,41 ^b ±0,07	69,86 ^a ±4,03
Bagaço de cana	32,81 ^c ±2,14	34,14 ^a ±0,20	5,09 ^a ±0,01	1,16 ^a ±0,12	0,66 ^a ±0,03	73,86 ^a ±2,50
Casca de jaboticaba	66,89 ^a ±1,04	2,27 ^d ±1,68	4,62 ^b ±0,01	1,78 ^a ±0,30	0,45 ^b ±0,01	76,01 ^a ±3,04
Bagaço de uva	47,87 ^b ±4,21	13,46 ^c ±3,26	5,07 ^a ±0,07	1,63 ^a ±0,38	0,47 ^b ±0,07	68,55 ^a ±7,99

NOTA: * Tratamento alcalino (NaOH 1M a 80°C por 24 horas); **Tratamento utilizando a fração sólida (1,4 Dioxano/HCl a 90°C por 4 horas); ***Tratamento utilizando a fração líquida (HCl 1M atingindo pH 6,0); ****Tratamento utilizando a fração líquida (HCl 2M para correção do pH 2,0); *****Tratamento utilizando Etanol 95%.

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Na reação B (Tabela 12), são observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) com elevadas perdas observadas nas matrizes bagaço de cana e casca de arroz,

evidenciando alta efetividade no tratamento ácido em associação com a temperatura para estas matrizes. Para a extração 1 é observada a mesma ação, mesmo com a variação das matrizes. O mesmo fato se repete para a reação C e na reação D em associação com a extração 2. Deste modo, ao avaliar a perda global após os tratamentos, nota-se que as matrizes não possuem diferença significativa e, ao avaliar o desvio padrão de todas elas, ocorre uma confluência e coesividade dos dados, quando avaliadas pelo teste de Tukey com p-valor $\leq 0,05$.

Após avaliar as perdas por reação, faz-se necessária a avaliação do produto a ser extraído e modificado, que é o percentual de lignina obtido pelo método de brometo de acetila. As análises quanto à lignina, utilizando o teste de Tukey, foram avaliados para a mesma matriz, visto que elas possuem porcentagens iniciais distintas entre si. Os resultados obtidos estão na Tabela 13.

Tabela 13. Percentual de lignina (gramas de lignina para cada 100 gramas de amostra) presente nas amostras sólidas ao longo do processamento.

	Inicial	Após reação A*	Após reação B**	Após reação C***	Após reação D****
Casca de arroz	16,88 ^a ±0,19	15,09 ^b ±0,21	10,14 ^c ±0,18	0,10 ^e ±0,02	2,26 ^d ±0,09
Bagaço de cana	21,25 ^a ±0,26	18,12 ^b ±0,08	13,00 ^c ±0,09	0,11 ^e ±0,01	2,18 ^d ±0,10
Casca de jaboticaba	11,70 ^a ±0,21	8,47 ^b ±0,01	7,00 ^c ±0,05	0,83 ^e ±0,02	2,34 ^d ±0,06
Bagaço de uva	15,72 ^a ±0,14	12,89 ^b ±0,94	9,89 ^c ±0,35	0,07 ^e ±0,01	2,14 ^d ±0,01

NOTA: * Tratamento alcalino (NaOH 1M a 80°C por 24 horas); **Tratamento utilizando a fração sólida (1,4 Dioxano/HCl a 90°C por 4 horas); ***Tratamento utilizando a fração líquida (HCl 1M atingindo pH 6,0); ****Tratamento utilizando a fração líquida (HCl 2M para correção do pH 2,0).

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por amostra em questão (linhas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

As quantidades de lignina, obtidos após cada reação, possui distinção sobre a sua constituição. Nota-se que o teste de Tukey explicita que maiores percentuais de lignina para todos os casos estão na fração inicial, seguida pelas obtidas após a reação A e após a reação B. Os casos após as reações C são frações basicamente

constituídas pelas outras frações da lignocelulose. O obtido após a reação D é constituído por uma pequena fração de lignina, mas ainda assim significativamente superior quando comparados aos obtidos após a reação C. Para o nosso estudo, foi avaliado o gradiente (diferença) entre os obtidos na reação A com a matriz inicial e o obtido após a reação B com o da reação A. Em valores absolutos, a maior variação é observada na diferença entre as reações A e B, exceto para a casca de jaboticaba, que possui uma variação maior após a reação A.

Li *et. al.* (2020b) expôs que, utilizando o bagaço de cana de açúcar, o tratamento alcalino reduziu 45,85% da quantidade inicial de lignina e 51,5% da massa total inicialmente, produzindo 4,1% de ácido p-cumárico e 0,41% de ácido ferúlico, do percentual de massa do bagaço de cana submetido à reação. Atatoprak *et. al.* (2022) utilizou um processo de deslignificação alcalina ao longo de 15 e 60 minutos para dois tipos de pedúnculos de uva (dos tipos vermelha e clara) e obteve os melhores resultados para reação de 60 minutos com a deslignificação de 50,61% e 45,58%, respectivamente. Porém, foi também obtido um aumento de 43,79% da concentração de glicose, comparado a métodos estudados com elevadas concentrações de bases fortes, utilizando alta temperatura (100°C) e álcali 1% (p/v).

Tais fatos explicitam os obtidos nas frações líquidas das matrizes após a reação B, que evidenciam também uma produção elevada de açúcares redutores e reduzida quantidade de lignina presente no residual de todas as matrizes, quando comparadas aos valores obtidos após a reação A. Isso se deve ao fato da alta exposição da matriz causada pelo tratamento alcalino auxiliado pela temperatura.

Deste modo, a análise complementar faz-se necessário para cada matriz. Para esta avaliação, a espectroscopia pode favorecer a interpretação e posteriormente a avaliação estrutural, comparando com os dados *in natura*.

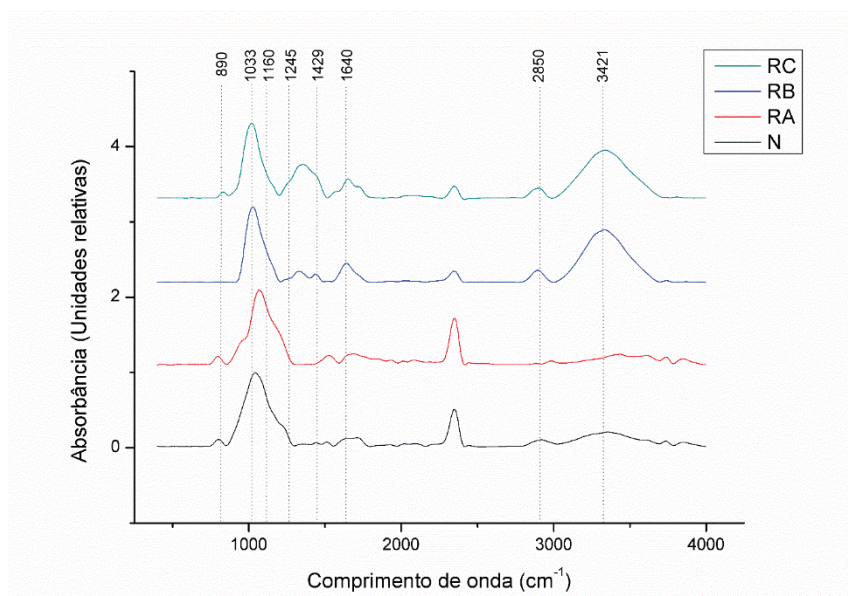
3.3.2.1. Espectroscopia (MIR-ATR)

As frações sólidas foram avaliadas utilizando a espectroscopia (MIR-ATR). Cada parcela correspondente foi agrupada de modo a corresponder o montante do processo. Deste modo quatro frações por matriz foram obtidas: a inicial (matriz sem tratamento - N), obtido após a reação A (tratamento alcalino - RA), obtido ao longo da

obtenção do extrato fenólico 1 (obtidas após a filtração na extração 1 - RC) e obtido ao longo da obtenção do extrato fenólico 2 (obtida após o tratamento ácido na reação B - RB). Os dados espectrais foram avaliados por matriz utilizando a análise de cluster (HCA) (Figuras 18 a 25).

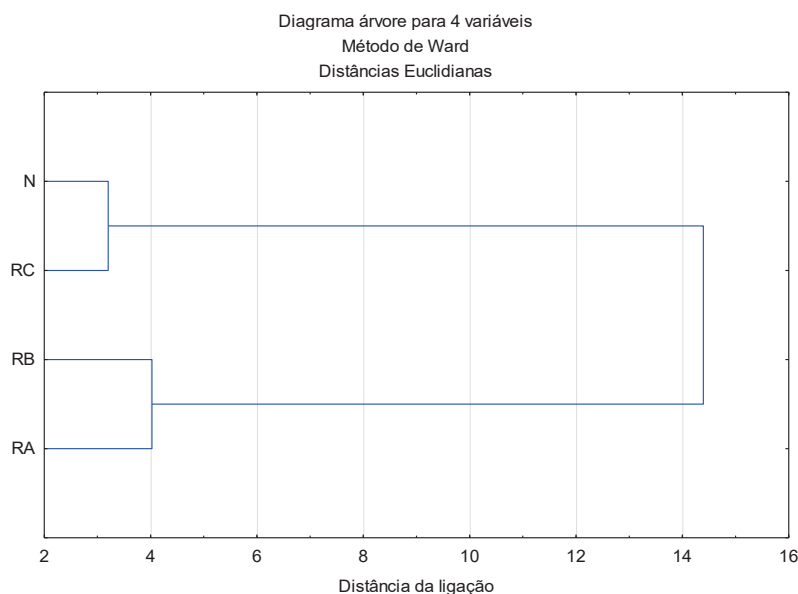
Ao avaliar a ação dos tratamentos aplicados sobre a mesma matriz, fica evidente que: (1) em todos os casos ocorre a similaridade de um dos tratamentos com a matriz sem processamento; (2) em todos os casos RC se assemelha mais a N do que as demais reações, sendo assim possível concluir que as outras reações foram responsáveis por uma desestruturação maior da matriz residual obtida; (3) Observa-se similaridade em todos os casos nas reações RA e RB, evidenciando que os mesmos dados obtidos após a reação alcalina foram extraídos ao longo da purificação, sendo possível agrupá-los em um posterior fluxo contínuo; (4) a similaridade entre N e RC em todos os casos evidenciam que RA possui maior significância reacional quando comparada a RC, que utiliza reação ácida; sendo assim o tratamento de maior eficiência quanto a modificação estrutural das matrizes em questão.

Figura 18. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento da casca de arroz.



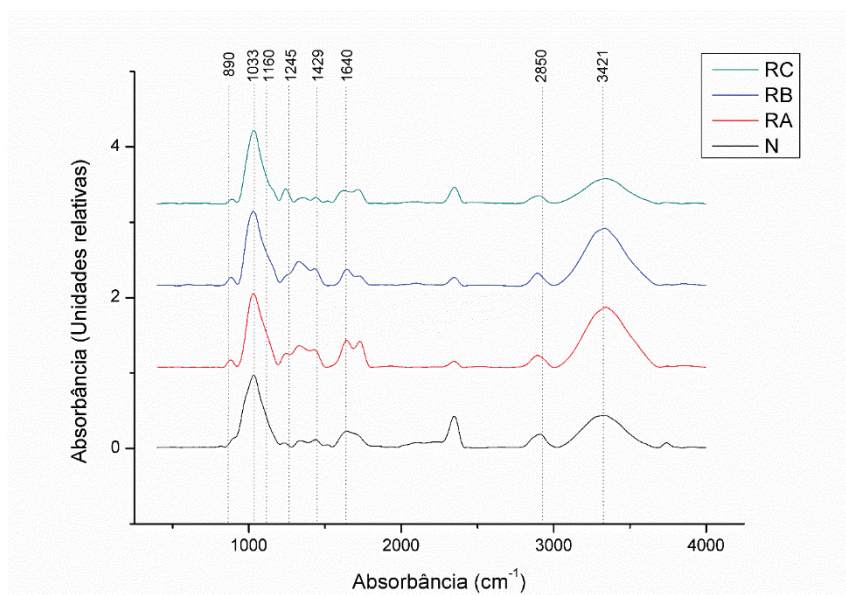
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 19. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a casca de arroz.



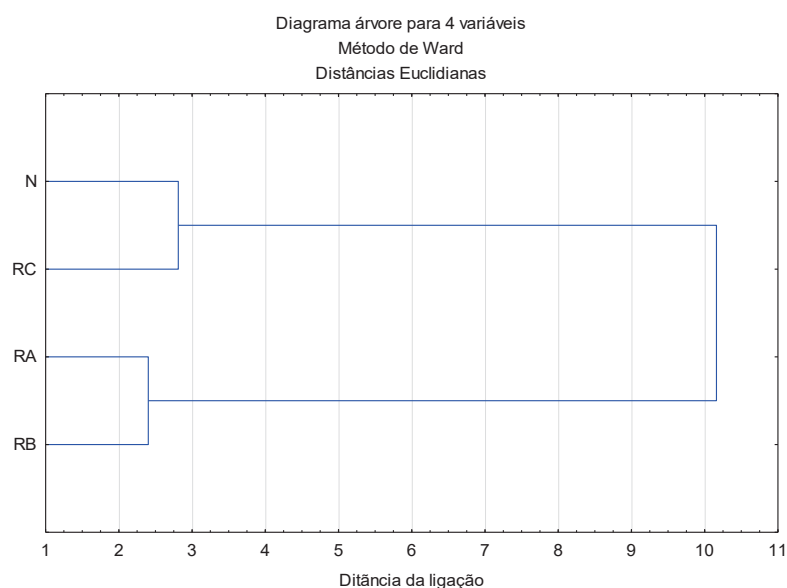
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 20. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento do bagaço de cana.



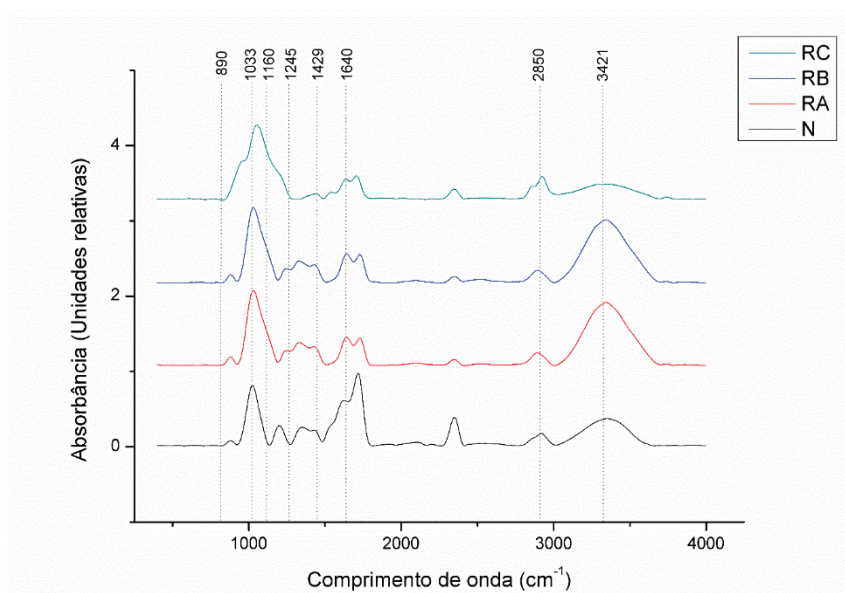
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 21. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes ao bagaço de cana.



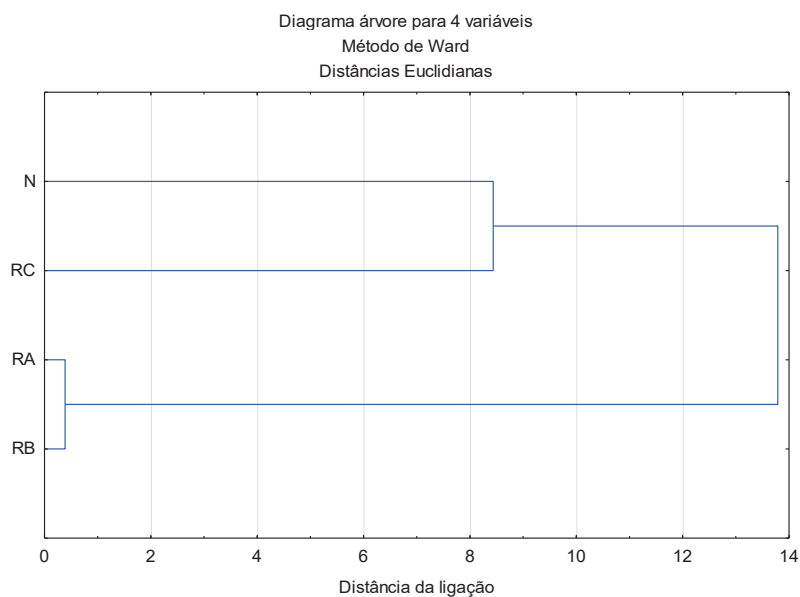
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 22. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento da casca de jaboticaba.



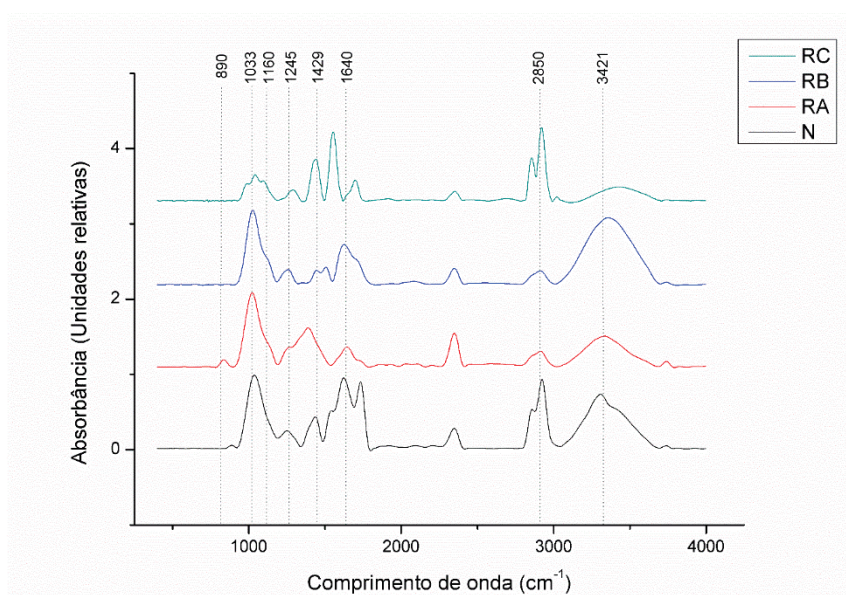
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 23. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a casca de jaboticaba.



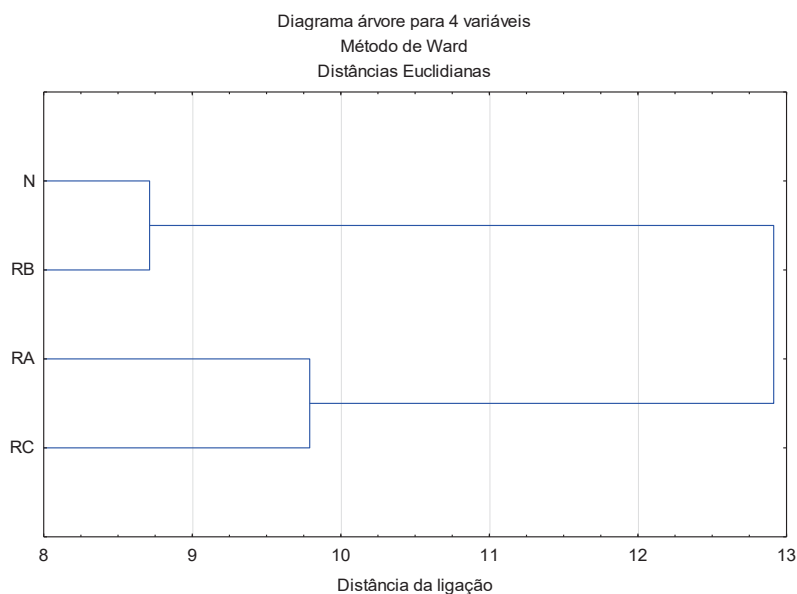
LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 24. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento do bagaço de uva.



LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

Figura 25. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a bagaço de uva.



LEGENDA: RC - Residual sólido do extrato fenólico 1; RB - Residual sólido do extrato fenólico 2; RA – Extrato sólido obtido na reação A; N – Matriz inicial sem processamento.

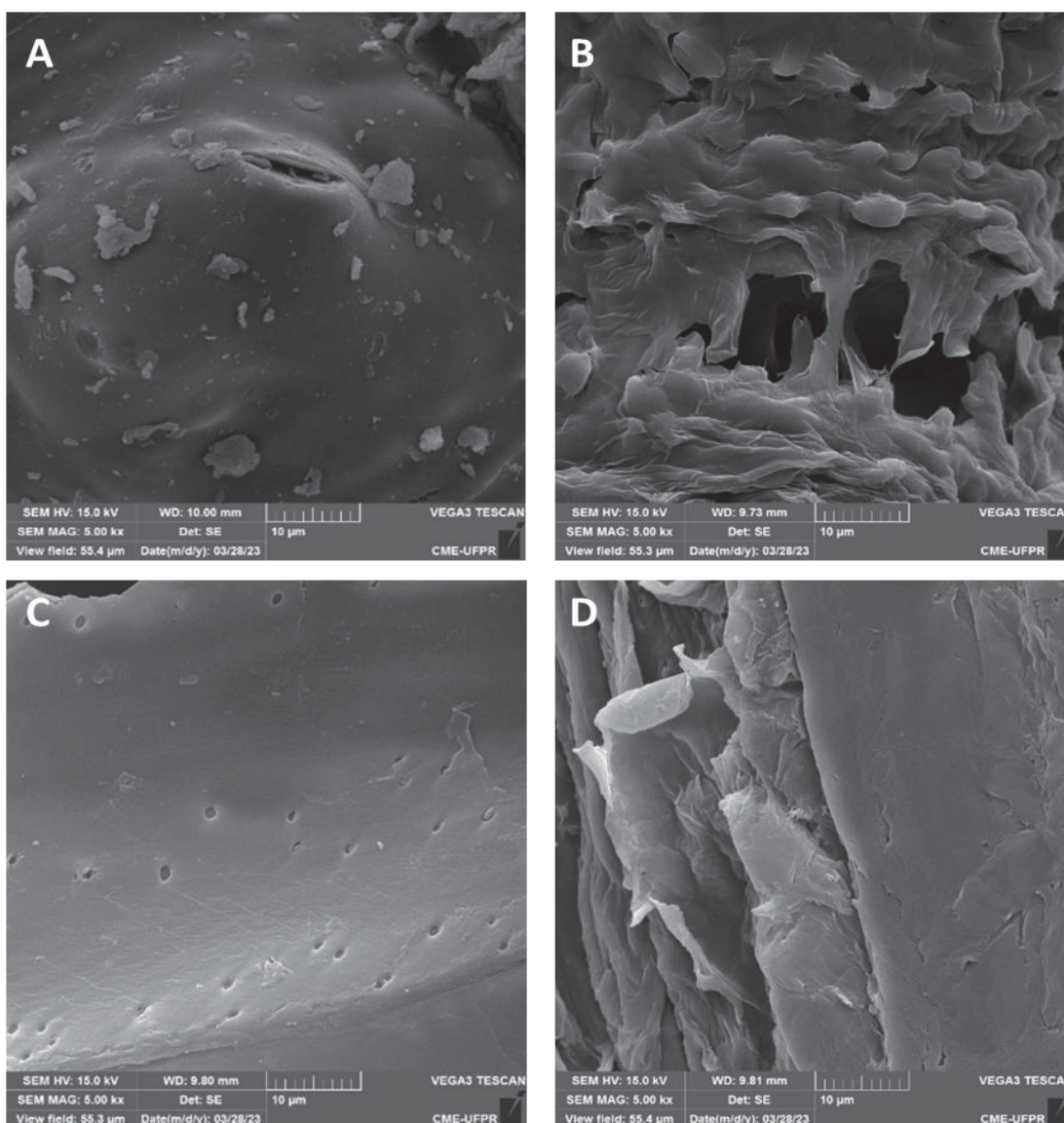
Após avaliar a composição, com auxílio dos espectros, fez-se necessária a verificação da modificação estrutural causada pela reação alcalina sobre a matriz obtida dos resíduos, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.3.2.2. MEV

Após obter o melhor tratamento para todas as matrizes (Reação alcalina), as amostras foram coletadas partindo do material seco obtido após filtração. Com isso as imagens obtidas (à direita das Figuras 26 e 27) se referem às matrizes tratadas e à esquerda as matrizes sem tratamento. Com isso é possível observar que: (1) para o caso da casca de arroz um rompimento estrutural e liberação de partículas que, após a reação foram transformadas em compostos fenólicos e açúcares redutores. Nela é possível observar a desorganização parcial da lignocelulose, comprovando a significância do tratamento diante da evidencia apresentada pelo HCA no item anterior para esta matriz; (2) para o caso do bagaço de cana, a matriz apresentou ranhuras profundas causadas pela ação alcalina mediante a redução da estabilidade estrutural de lignocelulose, ocasionando a liberação ao meio líquido de compostos fenólicos e também açúcares redutores, mas preservando a estrutura celulósica; (3) para o caso

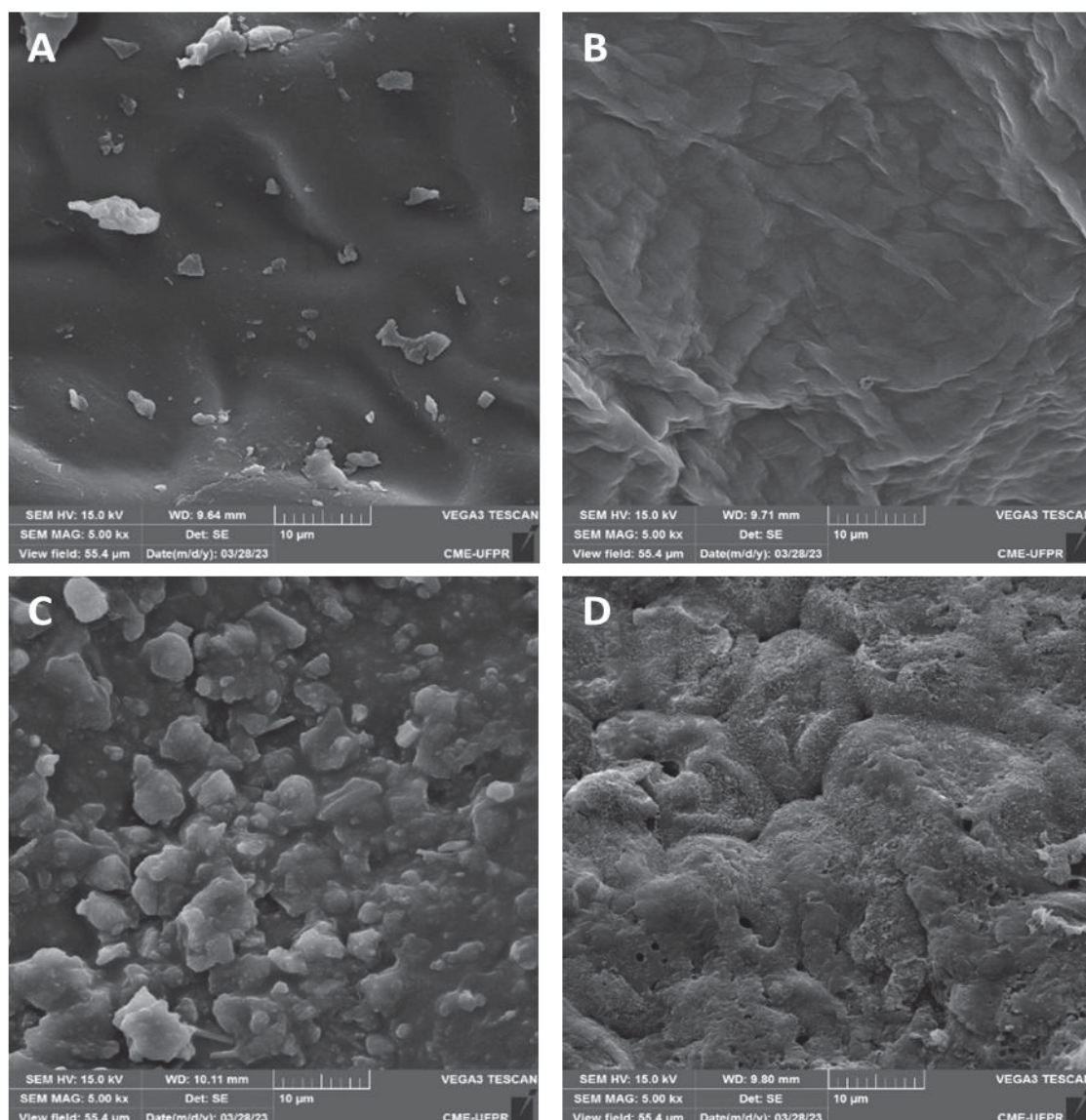
da casca de jaboticaba é notável a nova estrutura rugosa ocasionada principalmente pela hidrólise do amido presente na casca, comprovado pelo aumento de açúcares redutores presentes no extrato, além da liberação de compostos fenólicos; (4) para o caso do bagaço de uva a estrutura rugosa típica é observada, devido a modificação estrutural como a pectina, liberando assim um maior concentração de açúcares e proteínas da matriz para o meio líquido e, conseqüentemente, o aumento dos compostos fenólicos.

Figura 26. Imagens obtidas por MEV das matrizes sem tratamento (à esquerda) e com tratamento químico (à direita) para a casca de arroz e bagaço de cana.



LEGENDA: A- Casca de arroz (sem tratamento); B- Casca de arroz (após tratamento químico); C- Bagaço de cana (sem tratamento); D- Bagaço de cana (após tratamento químico).

Figura 27. Imagens obtidas por MEV das matrizes sem tratamento (à esquerda) e com tratamento químico (à direita) para a casca de jaboticaba e bagaço de uva.



LEGENDA: A- Casca de jaboticaba (sem tratamento); B- Casca de jaboticaba (após tratamento químico); C- Bagaço de uva (sem tratamento); D- Bagaço de uva (após tratamento químico).

3.4. CONCLUSÃO PARCIAL

O tratamento químico associado ao tratamento físico, demonstrou efetividade na obtenção de compostos fenólicos. Avaliando a fração líquida pode-se notar que o tratamento alcalino (Reação A) atuou sobre as matrizes de modo estatisticamente distinto, obtendo uma fração fenólica variando de 277,89 a 639,74 mg EAG g⁻¹ BS e uma concentração de açúcares redutores de 2,46 a 6,71 g L⁻¹ e a purificação aplicada nesta porção resultou em concentrações fenólicas de 522,19 a 617,78 mg EAG g⁻¹ BS e de açúcares redutores de 2,35 a 9,11 g L⁻¹. A reação ácida sobre a matriz recuperada após a reação A obteve maiores concentrações de compostos fenólicos totais variando de 415,49 a 633,36 mg EAG g⁻¹ BS e de açúcares redutores de 9,96 a 11,47 g L⁻¹, demonstrando que a reação modificou significativamente os carboidratos, livres ou ligados à matriz. Diante da alta concentração de compostos fenólicos totais, a análise de cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou que compostos distintos foram obtidos sob mesma reação nas diferentes matrizes. O bagaço de uva foi a melhor fonte de ácido gálico, epicatequina e procianidina B2. A casca de arroz apresentou as maiores concentrações de quercetina-3, ácido elágico, ácido caféico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, naringina e catequina; enquanto o bagaço de cana liberou as maiores concentrações de ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico. Avaliando as reações quanto seus espectros, é possível notar a similaridade dos produtos reacionais que constituem o extrato fenólico 1, principalmente quanto a lignina (1640 e 3421 cm⁻¹), sendo assim semelhantes mesmo utilizando matrizes significativamente distintas entre si.

Para a fração sólida, outras variáveis se tornam de interesse direto. A massa perdida ao longo dos tratamentos se diferencia significativamente, variando de 32,81 a 66,89 gramas a cada 100 gramas de amostra para a reação A e no total dos tratamentos de 68,55 a 76,01 gramas a cada 100 gramas de amostra. Isso demonstrando que cada tratamento atua de forma exclusiva à estruturação e complexidade do sistema. Avaliando o constituinte de interesse primordial desta etapa, o percentual de lignina a reação A (Tratamento alcalino) apresentou em média uma redução de 2,75%, enquanto o a reação B (Tratamento ácido) apresentou uma remoção de 3,63% de lignina. A reação B removeu um percentual de lignina significativamente maior quando comparado à reação A; contudo a modificação foi

observada na composição de carboidratos presentes na fração líquida (conforme mencionado anteriormente), produto de interesse para os próximos tratamentos. Diante de tais evidências, os espectros avaliados demonstraram similaridade da matriz sem tratamento com os obtidos após as reações executadas após o tratamento alcalino, se diferenciando significativamente dos dados obtidos após a reação A. Em todos os casos (Casca de arroz, bagaço de cana, casca de jaboticaba, bagaço de uva) a fração sólida obtida após o tratamento alcalino se difere das demais, também observado na fração líquida. Por fim, avaliando as imagens obtidas por MEV, foi possível concluir que a reação alcalina modificou significativamente a morfologia das matrizes, extraíndo compostos específicos de cada matriz e demonstrando que a reação alcalina é significativa na obtenção de compostos fenólicos, proporcionando ao sistema de biorrefinaria alta viabilidade financeira. Além disso, por proporcionar uma modificação estrutural significativa, propicia o estudo de outros tratamentos sobre estas matrizes, como tratamentos biológicos, com significância ao apelo global de processos industriais “verdes”.

CAPÍTULO 4: BIOCONVERSÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÚCARES REDUTORES

4.1. INTRODUÇÃO

A bioconversão de lignoceluloses em produtos como açúcares e compostos fenólicos depende da ação de microrganismos e/ou suas enzimas para extração da lignina e exposição da celulose para posterior sacarificação. A lignina é considerada um polímero natural recalcitrante da biomassa vegetal, e estudos demonstram que o seu estado cristalino ocasiona um aumento de sua temperatura de transição vítrea resultando em uma dificuldade de acesso à celulose (DZIADAS; JELEŃ, 2016; IBARRA et. al., 2019; MENDES et. al., 2018; TAKADA; CHANDRA; SADDLER, 2019; TAO et. al., 2019; YANG et. al., 2019).

O uso de pré-tratamentos biológicos em lignoceluloses é atrativo do ponto de vista ambiental, por permitir o rompimento eficiente da estrutura da lignina e da hemicelulose e exposição da celulose, e ao mesmo tempo a geração de subprodutos de menor toxicidade em comparação com outros processos (KHAN; AHRING, 2019; NOVIA et. al., 2019; YANG et. al., 2019). Esta reação consiste basicamente na ação de enzimas específicas, como as celulasas e as invertases, sobre os sítios ativos presentes nos poli e dissacarídeos. Com a remoção dos principais interferentes, a reação de sacarificação visa conversão da celulose em moléculas de menor massa molecular e a formação dos açúcares fermentescíveis. (DOS SANTOS et. al., 2016; IBARRA et. al., 2019; REINA et. al., 2016; SAINI; AGGARWAL; YADAV, 2018; TAO et. al., 2019).

Uma enzima amplamente estudada é a Lacase. Uma enzima polifenol oxidase que possui em sua estrutura um sítio ativo cúprico que tem a capacidade de catalisar a oxidação de substâncias contendo fenol, devido a redução do Cu^{2+} em Cu quando reage com fenólicos e retornando a sua forma inicial quando reduz O_2 presente no meio reacional (SHLEEV et. al., 2006). Bala e Singh (2019) utilizaram *Saccharum munja* e bagaço de cana, pré-tratada com lacase, para a produção de açúcares fermentescíveis, com uma remoção de 77% de lignina do meio reacional, evidenciando que o uso de lacase é efetivo na ação sobre tal substrato.

Neste contexto, o uso de complexos biológicos vem despertando interesse. Um estudo demonstrou uma modificação genética de *Chaetomium thermophilum*, usando como mediador do gene *Pichia pastoris*, para obter ferulol termo-resistente e esterase

estável sob pH 11, a fim de favorecer seu uso em biofilmes produzidos em biorrefinarias de materiais lignocelulósicos (HOU *et. al.*, 2021). Din *et. al.* (2021) utilizou cascas de coco maduras e jovens em um pré-tratamento alcalino e posteriormente hidrólise enzimática usando Accellerase®1500 (endog Lucanase, β -g Lucosidase e β -D-g Lucopyranoside) reduziu 20,15% de lignina do coco maduro e 31,17% do coco jovem. Já Del Rio *et. al.* (2019) utilizou a casca de arroz como substrato na sacarificação simultânea (usando CTec 2 Enzymatic Cocktail) e na co-fermentação. A capacidade de produção era de 91,9 g L⁻¹ de etanol. Outro exemplo é o uso de resíduos de banana com uma co-cultura (produção enzimática e ação enzimática concomitante) de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* (ATCC32691), onde foi obtido um rendimento de 0,4 g de etanol por grama de substrato e produtividade volumétrica estimada em 1,1 g L⁻¹h⁻¹ (UCHÔA *et. al.*, 2021).

Além de modificar a estrutura das matrizes e obter compostos fenólicos, o uso de enzimas tem por função modificar a celulose afim de se obter glicose, como produto. Uma variedade de casos vem sendo estudados pelos pesquisadores, a fim de reduzir os custos produtivos e acelerar a formação de glicose utilizando fontes diversas, como:

- Uso da palha de arroz, previamente tratada com vapor a 210°C por 10 minutos e após submetida a celulase para obtenção de açúcares fermentescíveis (WOOD *et. al.*, 2016);

- Uso de *Eucalyptus globulus*, pré-tratado com vapor e submetido à ação das lacases produzidas por *Marasmiellus palmovorus* VE111, melhorando a sacarificação em 25% e removendo 70% dos compostos fenólicos livres (SCHNEIDER *et. al.*, 2020).

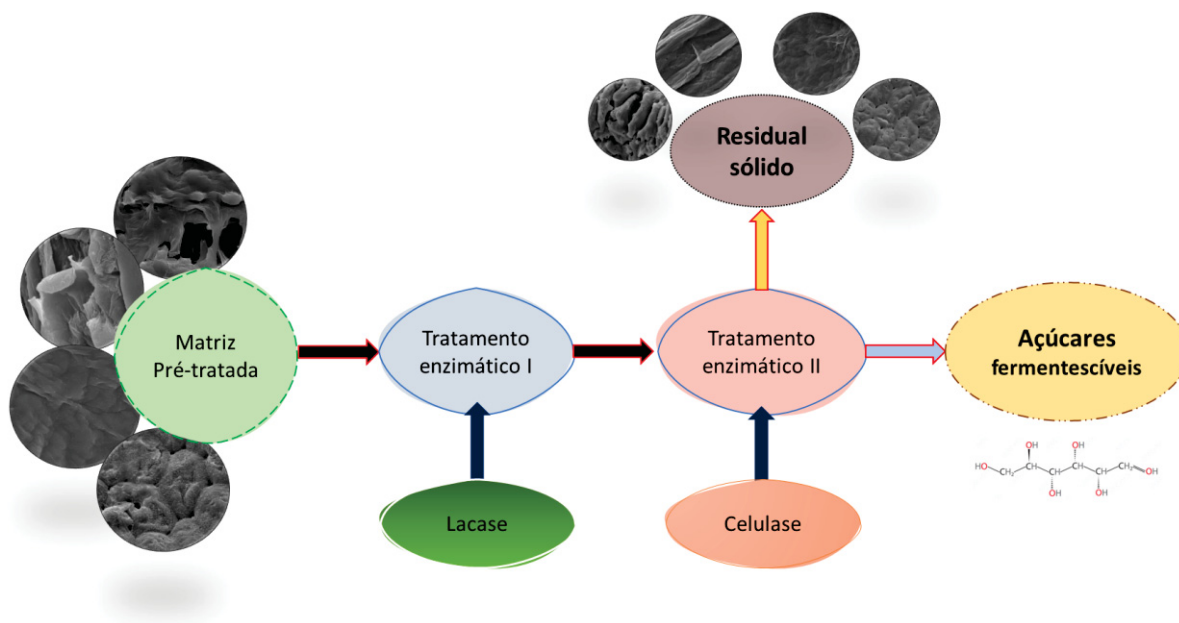
Portanto, a etapa descrita nesse capítulo objetivou a utilização dos residuais sólidos provenientes do tratamento alcalino utilizado como substrato na conversão das matrizes (casca de arroz, bagaço de cana, casca de jaboticaba e bagaço de uva) em açúcares fermentescíveis utilizando um tratamento enzimático, envolvendo o uso de lacases e celulasas. Tais amostras foram avaliadas por técnicas analíticas, espectrofotométricas e morfológicas de modo a descrever os resultados obtidos nesta etapa de sacarificação.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Obtenção de açúcares fermentescíveis

Com o tratamento químico e físico, as amostras foram modificadas estruturalmente, desnovelando a matriz lignocelulósica, secas e disponibilizada como substrato para a etapa atual. Nesta fase tem-se a transformação da matriz tratada (conforme o capítulo 3) passível na transformação de açúcares complexos em açúcares simples, onde ocorre a bio-disponibilização para a etapa final da biorrefinaria (que não será tratada neste trabalho). Tal etapa para obtenção de açúcares fermentescíveis está esquematizada na Figura 28.

Figura 28. Esquema representativo do tratamento enzimático a ser realizado sobre as matrizes para obtenção de açúcares fermentescíveis.



Para a geração dos açúcares fermentescíveis, temos três etapas fundamentais: (1) preparo da matriz fornecendo condições para o tratamento enzimático; (2) tratamento enzimático utilizando Lacase comercial; e (3) tratamento enzimático utilizando Celulase comercial. Tais etapas serão tratadas nos tópicos a seguir.

4.2.2. Tratamentos enzimáticos

Os tratamentos enzimáticos que foram realizados tem basicamente duas funções nesta etapa: (1) redução dos interferentes na ação da celulase sobre a matriz, utilizando a lacase (KUMAR; VERMA, 2020); e (2) sacarificação das matrizes previamente tratadas com o uso de celulases (ZHONG *et. al.*, 2021).

4.2.2.1. Preparo das matrizes tratadas

As matrizes utilizadas (casca de arroz, bagaço de cana, casca de jaboticaba e bagaço de uva) nesta etapa foram tratadas com NaOH, conforme o capítulo 3. Posteriormente a matriz foi seca e 3 gramas de cada matriz submetida a três tratamentos: (1) adição de 15 mL de água destilada e de lacase comercial; (2) adição de 15 mL de água, ajuste de pH com HCl 1M (pH 5,0) e adição de lacase comercial; e (3) adição de 15 mL de tampão acetato de sólido com pH 5,0 após lavagem da matriz utilizando 15 mL de uma solução contendo HCl 1M, seguida da adição de lacase comercial. As análises de açúcares redutores (DNS), compostos fenólicos totais (CFT) e espectrofotométrica foram aplicadas para a caracterização da fração líquida obtida após centrifugação (5000 rpm por 5 minutos). Para a fração sólida, as amostras foram secas e executadas as análises de massa recuperada (método gravimétrico), percentual de lignina (método de brometo de acetila), espectrofotometria e microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para verificar as alterações causadas pelos tratamentos.

A lacase comercial foi aplicada nos meios reacionais nas atividades iniciais de 0,5 e 1 U mL⁻¹, conforme trabalhos descritos por Pillet; Dufresne & Crelier (2021) e Jin & Wei (2023). Tal tratamento é chamado neste trabalho como tratamento enzimático I e detalhado posteriormente. Após o tratamento enzimático I, o tratamento enzimático II envolveu o uso das celulases.

4.2.2.2. Determinação das atividades enzimáticas

A atividade de lacase foi determinada utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51) sob comprimento de onda de 420 nm, no monitoramento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato)) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 (HOU *et. al.*, 2004). Uma unidade (U) de lacase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 micromol de ABTS por minuto. A atividade enzimática foi expressa como unidades por mililitro (U mL^{-1}).

A atividade de celulase total foi determinada segundo o método descrito por Ghose (1987), utilizando tiras de papel filtro como substrato. Brevemente, adicionou-se em um tubo de ensaio 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), 0,5 mL da celulase (Sigma-Aldrich) e uma tira de papel filtro Whatman Nº1 (50 mg). A reação foi realizada ao longo de 60 minutos a 50°C, e após a incubação, 3 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foi adicionado às amostras e os tubos colocados em banho-maria a 100°C por um período de 5 minutos. Após a fervura, os tubos foram resfriados em banho de água fria e 20 mL de água destilada foi adicionada às amostras. Então, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (BEL Photonics, UV-M51) a 540 nm. Para zerar o equipamento, a amostra foi substituída pelo tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. O branco de cada um dos experimentos foi obtido no mesmo processo descrito para a amostra, contudo na ausência do papel filtro (GHOSE, 1987). A atividade enzimática foi expressa como FPU mL^{-1} .

4.2.2.3. Reação enzimática I

Nesta etapa 3 g das amostras obtidas pós-tratamento alcalino foi utilizada, alocadas individualmente em erlenmeyer de 25 mL e o pH foi ajustado para 5,0 utilizando HCl 1M. Seguidamente 15 mL de acetato de sódio (pH 5,0) foi adicionado na matriz e posteriormente a enzima. A lacase comercial foi diluída em tampão acetato pH 5,0 e 50 mM e adicionada nesta etapa de modo a obter a atividade enzimática de 1 U mL^{-1} no meio reacional. A reação ocorreu em incubadora shaker (Limatec, LT600/1) a 50°C por 72 horas e agitação de 120 rpm, conforme utilizado por Matei *et. al.* (2020).

4.2.2.4. Reação enzimática II

A fração sólida proveniente da reação enzimática I (uso das lacases) foi utilizada nesta etapa. Contudo, para que não houvesse interferência da lacase, a totalidade da reação enzimática I foi submetido à inativação enzimática com elevação de temperatura (até a fervura). Posteriormente o volume médio de 20 mL foi submetido à ação da celulase. A enzima comercial foi utilizada na reação com uma atividade enzimática inicial de 10 U mL⁻¹. A reação ocorreu em incubadora shaker (Limatec, LT600/1) a 50°C por 72 horas e agitação de 120 rpm, conforme utilizado por Matei *et al.* (2020).

4.2.3. Caracterização das frações sólidas e líquidas

A caracterização das matrizes foi executada em duas frações: a líquida (extrato) e a sólida. Para os casos envolvendo as matrizes pós-tratamento alcalino submetidos à ação da lacase, foram mensurados a massa recuperada e o percentual de lignina da fração sólida e açúcares redutores (DNS) e compostos fenólicos totais (CFT) para a fração líquida. Partindo dos melhores casos observados foram executadas as análises de MIR-ATR e HPLC para a fração líquida e MIR-ATR e MEV para a fração sólida. As metodologias foram detalhadas abaixo.

4.2.3.1. Fração líquida

O meio reacional líquido foi avaliado quanto aos fenólicos pelo método de Follin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), aos açúcares redutores pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (SAQIB; WHITNEY, 2011), cromatografia líquida e quanto a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada. As duas últimas análises mencionadas foram executadas para o melhor caso para cada matriz, após avaliar a análise estatística executada.

a) Quantificação de compostos fenólicos totais

A curva de calibração de ácido gálico foi obtida no intervalo de concentração de 45 a 450 mg L⁻¹. Em balões volumétricos de 10 mL, as amostras foram preparadas pipetando 5 mL de água destilada (100 µL de solução diluída de ácido gálico) então adicionado 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Foi mantido em repouso por 3 minutos e adicionado 2 mL de solução de carbonato de cálcio a 15 %. Os balões foram agitados e as soluções avolumadas e homogeneizadas. As amostras foram alocadas ao abrigo da luz por 2 horas e seguidamente mensuradas as absorbâncias em espectrofotômetro a 765 nm. As amostras dos sobrenadantes filtrados provenientes dos tratamentos foram utilizadas em volumes idênticos aos dos reagentes, substituindo apenas o volume de solução de ácido gálico pelo amostral. Com isso, as soluções foram alocadas igualmente por 2 horas na ausência de luz e suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 765 nm. As unidades para essa análise são expressas em miligrama equivalente de ácido gálico por grama em base seca (mg EAG g⁻¹ BS). Tal curva é descrita no apêndice 3.

b) Quantificação de açúcares redutores

Consistiu em três etapas: (1) Preparo do reagente DNS: Em um béquer de 1 L, foi adicionado 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g de tartarato sódio e potássio em 800 mL de hidróxido de sódio 0,5 M, sob agitação magnética e leve aquecimento. Após a solubilização dos sólidos, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e avolumada com água destilada; (2) Obtenção da curva padrão: A curva padrão foi obtida utilizando concentrações conhecidas de açúcares redutores, dentro de um intervalo específico de concentração relacionada com a absorbância da amostra após a reação com o reagente anteriormente preparado; (3) Análise das amostras: Amostras com alta concentração de açúcares foram diluídas a fim de adequá-las a curva padrão anteriormente obtida, sendo necessário corrigir o valor obtido para o valor real amostral, multiplicando pela diluição realizada. Com isso a mistura de 1 mL de amostra para 4 mL do reagente DNS foi agitada em vórtex por 30 segundos, seguido pela alocação destes em banho-maria com temperatura da água no estado em ebulição ao longo de 5 minutos. As amostras foram resfriadas até a

temperatura ambiente. Após o resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Tais curvas estão no apêndice 2.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) foi executada em cromatógrafo Shimadzu Prominence com detector de arranjo de diodos. A análise foi realizada após otimização realizada pelo Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) da Sede Ecoville do Campus Curitiba da UTFPR. As análises foram separadas para a detecções dos padrões em três misturas sob as seguintes condições: (1) detecção de catequina, cianidina 3-cloreto de glucosídeo e procianidina B2, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de acetonitrila, metanol e ácido fosfórico (0,1% em água) ao longo de 45 minutos; (2) ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, naringina e ácido trans-cinâmico, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de acetonitrila e ácido acético (pH 3,07) ao longo de 70 minutos; (3) quercetina 3/isoquercetina, ácido elágico e quercetina, utilizando uma coluna C18 (Acclaim 120, 250x6mm) e fase móvel gradiente de metanol e ácido fosfórico (0,1% em água) ao longo de 38 minutos.

Todos os padrões utilizados para a obtenção das curvas padrão, possuem alto grau de pureza e são da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo/SP). Os reagentes líquidos foram de padrão cromatográfico e adquiridos da empresa Êxodo Científica (Sumaré/SP).

d) Espectroscopia (MIR-ATR)

A análise ocorreu de modo a avaliar a intensidade e/ou possíveis deslocamentos de bandas correspondentes ante aos compostos de interesse, como frações correspondentes dispersas de lignina, hemicelulose e celulose. Foi utilizado um espectrômetro (Bruker, Vertex 70) equipado com cristal carbono, em uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com acessório de refletância total atenuada (MIR-ATR) na faixa espectral

de 500-4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . A análise foi conduzida no Laboratório de FTIR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a análise das bandas correspondentes foi utilizada a Tabela 6.

4.2.3.2. Fração sólida

As frações sólidas obtidas após os tratamentos foram caracterizadas para se avaliar a porcentagem de lignina (método do brometo de acetila), a massa recuperada (método gravimétrico), os grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada e a morfologia por microscopia eletrônica de varredura. As duas últimas análises mencionadas foram executadas apenas para o melhor caso observado pelas análises estatísticas executadas.

a) Determinação da porcentagem de lignina nas biomassas (Brometo de acetila)

A análise espectrométrica de lignina em brometo de acetila foi utilizada para quantificação da porcentagem de lignina nas frações sólidas, segundo o método descrito por Moreira-Vilar *et. al.* (2014): A reação contendo 20 mg de amostra e 0,5 mL de 25% de brometo de acetila (v/v em ácido acético glacial) foi incubada a 70°C por 30 minutos. Posteriormente a amostra foi resfriada e adicionou-se 0,9 mL de NaOH (2M), 0,1 mL de hidroxalamina-HCl (5M), completando-se o volume de cobertura amostral utilizando ácido acético glacial (4-6 mL). O conteúdo da reação foi centrifugado (1400 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante utilizado para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 280 nm com cubetas de quartzo (BEL Photonics, UV-M51). A curva padrão foi constituída por aumento da concentração de lignina pura (95% de pureza – Sigma Aldrich) e pode ser visualizada no Apêndice 1.

b) Massa (Método gravimétrico)

O método gravimétrico consiste em avaliar a perda de massa da amostra ao longo do tratamento. Foi utilizado nesta análise a estufa a 50°C para a secagem e acompanhada a variação do peso ao longo do tempo. Ao se notar a manutenção do

peso (cerca de 2 horas de secagem) foi subtraído da massa inicial a massa final após a secagem. Tal diferença resultante é a massa perdida no processo ou procedimento realizado, sendo obtido por uma balança de precisão.

c) Espectroscopia (MIR-ATR)

A análise ocorreu de modo a avaliar a intensidade e/ou possíveis deslocamentos de bandas correspondentes ante aos compostos de interesse, lignina, hemicelulose e celulose. Foi utilizado um espectrômetro (Bruker, Vertex 70) equipado com cristal carbono, em uma temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com acessório de refletância total atenuada (MIR-ATR) na faixa espectral de $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 4 cm^{-1} . A análise foi conduzida no Laboratório de FTIR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a análise das bandas correspondentes foi utilizado a Tabela 6.

d) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da superfície das amostras foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR). As micropartículas foram fixadas em suporte de alumínio e submetidas à metalização com ouro sob vácuo (SCD-030). Para visualização das amostras, foram utilizados aumentos de 1000 e 5000x, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Tescan, Vega 3, Kohoutovice, República Tcheca) com potencial de aceleração de 15 kV.

4.2.4. Análises estatísticas

a) Teste de Tukey

O Teste de Tukey é utilizado para avaliar semelhanças e diferenças de valores obtidos quanto a concentrações, percentuais e outras análises. Tal teste executa a comparação das médias, partindo de dados oriundos da análise de variância (ANOVA). Este utiliza o teste F para a análise da diferença mínima significativa (DMS)

entre amostras, com uma amplitude estudentizada, quadrado médio dos resíduos da anova e tamanho amostral dos grupos. Porém, não avalia diferenças entre tratamentos, mas sim entre os grupos dentro do mesmo tratamento (ABDI; WILLIAMS, 2010). O teste foi executado utilizando o software Microsoft Excel (2022).

b) Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA), foi aplicada utilizando o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

Primeiramente, os dados (espectros são mais utilizados) são organizados no formato de uma matriz X. Para tanto, cada linha da matriz X contém um grande grupo de dados enquanto cada coluna da matriz X apresenta as informações das variáveis nos diferentes aspectos analisados. O princípio da PCA consiste em decompor a matriz X em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (T) e outra chamada de *loadings* (PT) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). A matriz de scores carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz X, enquanto os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de X. Os resultados da decomposição da matriz X em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA *et. al.*, 2016).

c) Análise hierárquica de clusters (HCA)

A HCA é uma análise de agrupamentos utilizada para unir amostras semelhantes e classificá-las de acordo com suas características únicas. O software utilizado para esta análise foi o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

A análise consiste basicamente em determinar a proximidade (distâncias) entre os dados e assim definir suas similaridades ou diferenças. Tal análise utilizou duas ferramentas para a obtenção dos resultados: (1) o método de Ward: técnica hierárquica de partições que consiste em determinar, com auxílio de algoritmo computacional, uma combinação dos dados vetoriais de modo a reduzir a variação interna dos dados, do tipo centroides; (2) a distância Euclidiana: análise mais popular utilizada, avalia a iteração entre dois pontos, uma distância vetorial, similar ao de

componentes principais, conforme descrito no item anterior (CARTER; MORRIS; BLASHFIELD, 1989; GHENDOV-MOSANU *et. al.*, 2022a; LANDAU; CHIS STER, 2010).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1. Preparo das matrizes e avaliação da atividade enzimática

Os dados de massa recuperada, porcentagem de lignina removida, açúcares redutores (DNS) e concentração de compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados após a reação enzimática I (Tabela 14). Como a porcentagem de lignina varia entre as matrizes, fez-se necessário determinar a redução dela e comparar os valores obtidos após reação alcalina para possibilitar a verificação da ação da lacase sobre a matriz seca, pré-tratada conforme o Capítulo 3.

Tabela 14. Dados obtidos após o tratamento das matrizes utilizando Lacase comercial em concentrações diferentes avaliando a geração dos produtos nas frações líquidas (DNS e CFT) e sólidas (Lignina e massa recuperada).

Matriz	Lacase (U mL ⁻¹)	Massa recuperada (%)	DNS (g L ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹ BS)	Lignina removida (%)
Casca de arroz	0,5	72,93 ^a ±0,90	4,41 ^f ±0,02	97,45 ^b ±6,76	1,5 ^a ±0,15
	1,0	66,36 ^{bcd} ±2,41	5,17 ^c ±0,02	133,52 ^a ±4,01	1,55 ^a ±0,14
Bagaço de cana	0,5	63,14 ^d ±0,13	4,28 ^f ±0,01	97,28 ^b ±4,27	1,78 ^a ±0,07
	1,0	64,55 ^{cd} ±1,59	4,66 ^e ±0,03	97,78 ^b ±4,70	1,71 ^a ±0,07
Casca de jaboticaba	0,5	69,13 ^{ab} ±0,48	5,65 ^a ±0,04	78,37 ^c ±2,22	1,23 ^a ±0,11
	1,0	67,52 ^{bc} ±1,04	4,76 ^{de} ±0,03	123,25 ^a ±7,83	1,26 ^a ±0,1
Bagaço de uva	0,5	65,96 ^{bcd} ±0,38	5,30 ^b ±0,08	89,38 ^{bc} ±0,51	1,34 ^a ±0,65
	1,0	68,97 ^{ab} ±2,63	4,82 ^d ±0,05	89,04 ^{bc} ±4,70	1,39 ^a ±0,68

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 14, observa-se a perda mássica da matriz submetida e a geração de açúcares redutores e liberação de compostos fenólicos. Analisando tais valores, nota-se uma redução da porcentagem de lignina neste tratamento em todos os casos, confirmado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). No entanto, a redução de lignina é significativamente inferior quando comparados os dados obtidos do tratamento químico, que em média foi de 2,75% do total. Com isso,

é possível concluir que o tratamento enzimático não foi tão eficiente quando comparado ao tratamento alcalino, reduzindo em média $1,49 \pm 0,25$ grama por amostra. Visando a melhoria desta etapa fez-se necessário o controle de outras variáveis, como pH e temperatura.

Dentre os inúmeros fatores que pode interferir na atividade enzimática da lacase produzida por *Trametes versicolor*, o pH e a temperatura apresentam maior impacto. Kurniawati e Nicell (2008) observou a estabilidade da lacase produzida por *T. versicolor* entre a faixa de pH de 5,0 a 8,0 em uma temperatura de 25°C, porém a atividade da lacase na oxidação de fenólicos sob pH de 4,0 a 7,0 e temperaturas de 10 a 60°C. Tal estudo também demonstrou que temperaturas mais altas elevam a geração de componentes, ocasionando uma inativação térmica após uma hora de reação. Sun *et. al.* (2021) avaliaram a biorremediação assistida por lacase produzida por *T. versicolor* na eliminação de estrogênio e obtiveram a melhor atividade da enzima em pH de 5,0, onde um pH inferior causou declínio nas constantes de velocidade de reação (k_{prcs}).

Avaliando tais estudos, a provável solução para um aumento na atividade enzimática é o ajuste de pH a 5,0 utilizando HCl 1M. Com isso o mesmo caso anteriormente proposto foi estudado, porém com um ajuste do pH 5,0. Os resultados estão expressos na Tabela 15.

Comparando os obtidos na Tabela 15, nota-se um aumento porcentagem de lignina removida em todos os casos, sendo observada uma diferença significativa entre as amostras. Um caso em especial se difere das outras de modo significativo, a casca de jaboticaba não teve resultado satisfatório na reação, com variação decimal na porcentagem de lignina. Porém, para todos os casos observa-se uma menor perda de massa, demonstrando que a ação alcalina com temperatura de 50°C ainda atuava sobre a matriz, gerando compostos como açúcares redutores e fenólicos.

Tabela 15. Dados obtidos após tratamento enzimático com ajuste de pH 5,0 utilizando HCl 1M.

Matriz	Lacase (U mL ⁻¹)	Massa recuperada (%)	DNS (g L ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹ BS)	Lignina removida (%)
Casca de arroz	0,5	72,03 ^a ±0,49	1,51 ^b ±0,03	57,39 ^{bc} ±3,22	3,12 ^b ±0,20
	1,0	68,31 ^{abc} ±1,03	1,39 ^{bc} ±0,05	55,71 ^c ±2,66	3,28 ^b ±0,11
Bagaço de cana	0,5	65,07 ^c ±0,13	1,33 ^c ±0,01	70,44 ^{ab} ±4,06	4,53 ^a ±0,08
	1,0	64,57 ^c ±1,55	1,33 ^c ±0,06	57,39 ^{bc} ±3,22	4,56 ^a ±0,10
Casca de jaboticaba	0,5	64,98 ^c ±0,96	2,88 ^a ±0,09	53,71 ^c ±10,19	1,89 ^c ±0,17
	1,0	66,36 ^b ±2,40	1,34 ^{bc} ±0,02	62,07 ^{bc} ±5,80	1,86 ^c ±0,17
Bagaço de uva	0,5	71,52 ^a ±2,90	2,96 ^a ±0,12	56,72 ^{bc} ±1,01	3,07 ^b ±0,29
	1,0	70,81 ^{ab} ±2,61	1,43 ^{bc} ±0,02	77,13 ^a ±3,53	3,14 ^b ±0,28

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Como as lacases tem ação direta sobre a lignina, a modificação estrutural para liberação de açúcares está possivelmente relacionada a ação química ou física. Matei *et. al.* (2020) obtiveram como variável significativa para a casca de arroz a utilização de um tampão de acetato de sódio (com pH 5,0) ao longo do tratamento enzimático, melhorando significativamente a modificação enzimática e produzindo grandes quantidades de açúcares redutores para o mix enzimático estudado. Deste modo, foi utilizado na próxima etapa um meio tamponado com pH 5,0 para aumentar a efetividade enzimática e proporcionar condições para a ação de celulase na próxima etapa. Os resultados obtidos com a modificação do meio líquido reacional estão descritos na Tabela 16.

Avaliando os resultados obtidos com o ajuste de pH seguido de adição tampão pode-se observar a redução significativa do percentual de lignina presente nas amostras, além de uma redução do percentual mássico recuperado.

Tabela 16. Tratamento enzimático das biomassas com lacases em meio tamponado (tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0) e com correção de pH.

Matriz	Lacase (U mL ⁻¹)	Massa recuperada (%)	DNS (g L ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹ BS)	Lignina removida (%)
Casca de arroz	0,5	26,71 ^d ±0,99	1,18 ^b ±0,20	58,72 ^b ±2,00	3,48 ^{cd} ±0,29
	1,0	22,79 ^e ±1,05	1,35 ^b ±0,07	57,72 ^b ±4,60	3,87 ^c ±0,14
Bagaço de cana	0,5	47,19 ^c ±1,22	1,49 ^b ±0,29	53,03 ^b ±2,53	4,56 ^b ±0,15
	1,0	18,35 ^f ±1,12	1,24 ^b ±0,12	58,39 ^b ±4,06	5,38 ^a ±0,15
Casca de jaboticaba	0,5	27,70 ^d ±0,99	2,89 ^a ±0,12	54,04 ^b ±1,53	1,86 ^e ±0,15
	1,0	21,02 ^{ef} ±0,83	1,50 ^b ±0,04	58,39 ^b ±9,05	2,30 ^e ±0,13
Bagaço de uva	0,5	58,05 ^a ±0,93	1,18 ^b ±0,37	78,13 ^a ±1,16	3,13 ^d ±0,19
	1,0	50,19 ^b ±1,09	1,54 ^b ±0,05	72,44 ^a ±5,88	3,68 ^c ±0,18

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Nazar *et. al.* (2022) utilizou Lacases obtidas de *Bacillus ligniniphilus* L1 e obteve uma redução de 8,93% da porcentagem de lignina e 44,8% da concentração de compostos fenólicos da casca de arroz. Deng *et. al.* (2019b) utilizou um pré-tratamento contendo lacase e 1-hidroxibenzotriazol, melhorando o acesso da celulase ao seu sítio ativo, ampliando em 26% os açúcares redutores convertidos e uma reduzindo em 28% a lignina presente. Com isso é possível observar que o ajuste de pH e tamponamento se fez necessário. Com os dados da Tabela 17, podemos observar a interferência da porcentagem de lignina sobre ação da celulase, devido à elevada concentração destes compostos presente nas amostras.

Analisando a Tabela 17 pode-se concluir que o ajuste de pH resultou em resultados significativamente melhores, quando comparados ao caso sem ajuste. Porém a literatura evidencia que um aumento da atividade de lacase é obtido com a utilização de tampão, substituindo a água. Deste modo, com a alteração mencionada e aumentando a atividade de lacase, é observado uma redução da porcentagem de lignina presente na amostra sólida. No entanto, é necessário avaliar se a lacase, após inativada, não se tornará influente na reação envolvendo a celulase, conforme mencionado por Deng *et. al.* (2019b). Nota-se que a redução de lignina neste trabalho atingiu valores de até 39,67%, removendo assim possíveis interferentes. Sendo

assim, essa redução precisou ser avaliada quanto a ação da lacase, de modo sequencial ao tratamento enzimático I.

Tabela 17. Redução do percentual de lignina das amostras tratadas com lacase em diferentes condições de pH.

Matriz	Lacase (U mL ⁻¹)	Redução de lignina no meio aquoso (%)	Redução de lignina com o ajuste de pH em meio aquoso (%)	Lignina removida do meio tamponado após ajuste de pH (%)
Casca de arroz	0,5	11,03 ^b ±1,50	26,06 ^d ±1,90	29,97 ^c ±1,41
	1,0	11,45 ^b ±1,40	27,77 ^{cd} ±1,10	34,49 ^b ±0,68
Bagaço de cana	0,5	10,89 ^b ±0,70	33,33 ^a ±0,80	35,79 ^{ab} ±1,21
	1,0	10,42 ^b ±0,70	33,62 ^a ±1,10	39,67 ^a ±1,54
Casca de jaboticaba	0,5	16,98 ^a ±1,10	28,72 ^{bcd} ±1,70	30,15 ^c ±1,25
	1,0	17,47 ^a ±1,00	28,14 ^{cd} ±1,74	34,79 ^b ±1,59
Bagaço de uva	0,5	11,60 ^b ±1,28	31,26 ^{abc} ±0,58	33,98 ^{bc} ±1,85
	1,0	12,09 ^b ±1,32	32,21 ^{ab} ±0,52	37,70 ^{ab} ±1,86

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

4.3.2. Definição da reação enzimática I e II.

As reações enzimáticas I (uso da lacase em um sistema tamponado com pH 5,0) seguida de II (uso de celulase) foram combinadas, sendo os dados apresentados na Tabela 18. Para o uso sequencial, a reação enzimática I foi submetida à fervura para a inativação enzimática, seguido de resfriamento e adição das celulasas.

O teste de Tukey foi aplicado para cada matriz (conjunto da combinação dos experimentos variando e combinando os tratamentos enzimáticos) de modo a definirmos o melhor caso para cada matriz, e ao fim avaliar se para todas as matrizes se aplica o melhor caso. Para a casca de arroz, nota-se que a formação de açúcares redutores atingiu 12,34 g L⁻¹ utilizando os máximos estipulados para cada enzima aplicada. Resultados semelhantes foram observados para o bagaço de cana (12,33 g L⁻¹), casca de jaboticaba (12,44 g L⁻¹) e bagaço de uva (11,19 g L⁻¹), utilizando também as maiores atividades enzimáticas. Tais resultados são os de maior significância também pelo teste de Tukey (p≤0,05), evidenciados pelo subíndice “a” em cada caso.

Com isso é observado um comportamento padrão entre as amostras quando submetidas ao mesmo tratamento enzimático (tratamento enzimático I e II).

Tabela 18. Resultados obtidos por uso de Lacase, seguido da reação de celulase.

Matriz	Lacase (U mL ⁻¹)	Celulase (FPU mL ⁻¹)	Massa recuperada (%)	DNS (g L ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹ BS)	Lignina removida (%)
Casca de arroz	0,5	5,0	80,71 ^a ±0,19	5,84 ^d ±0,24	53,71 ^a ±3,01	26,91 ^{bc} ±0,15
		10,0	69,84 ^{bc} ±2,48	8,21 ^c ±0,55	60,73 ^a ±3,48	22,20 ^c ±0,16
	1,0	5,0	72,12 ^b ±3,52	10,80 ^b ±0,38	51,70 ^a ±6,11	29,42 ^a ±0,14
		10,0	63,80 ^c ±2,72	12,34 ^a ±0,06	54,71 ^a ±9,58	25,24 ^b ±0,15
Bagaço de cana	0,5	5,0	92,00 ^a ±0,90	4,58 ^c ±0,11	52,70 ^{bc} ±14,79	30,84 ^b ±0,15
		10,0	90,11 ^{ab} ±1,14	11,65 ^b ±0,29	81,15 ^a ±5,15	26,38 ^c ±0,16
	1,0	5,0	64,90 ^c ±3,76	12,41 ^a ±0,09	42,66 ^c ±2,66	33,22 ^a ±0,14
		10,0	84,86 ^b ±1,33	12,33 ^a ±0,03	69,77 ^{ab} ±13,05	30,79 ^b ±0,37
Casca de jaboticaba	0,5	5,0	86,96 ^a ±2,42	4,59 ^d ±0,28	53,04 ^a ±8,36	27,74 ^b ±0,04
		10,0	74,98 ^b ±4,16	11,90 ^b ±0,01	60,73 ^a ±4,18	23,02 ^d ±0,04
	1,0	5,0	57,12 ^c ±2,49	8,91 ^c ±0,20	55,04 ^a ±2,03	30,22 ^a ±0,04
		10,0	45,83 ^d ±1,81	12,44 ^a ±0,04	63,08 ^a ±1,58	26,09 ^c ±0,04
Bagaço de uva	0,5	5,0	91,57 ^a ±1,43	3,77 ^d ±0,03	54,04 ^{ab} ±13,10	29,56 ^b ±0,05
		10,0	86,81 ^b ±2,55	8,69 ^b ±0,11	45,34 ^b ±4,18	24,98 ^d ±0,05
	1,0	5,0	63,85 ^d ±0,85	7,43 ^c ±0,05	44,00 ^b ±0,58	31,96 ^a ±0,04
		10,0	71,27 ^c ±1,37	11,19 ^a ±0,24	72,11 ^a ±2,32	27,93 ^c ±0,05

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) para a mesma matriz (variando as combinações de lacase e celulase) e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Masran *et. al.* (2020) utilizou lacase e celulase no tratamento de cachos vazios de frutos de dendê obtendo inibição enzimática mínima de 5% e 8%, respectivamente. Além disso, conseguiu a produção de 10,90 g L⁻¹ de açúcares redutores para o uso do coquetel enzimático (na proporção 45 Ug⁻¹:25 FPUg⁻¹) com um rendimento de 32,62% ao longo de 72 horas de reação. Com isso é possível avaliar que nosso trabalho foi capaz de atingir valores similares, demonstrando a possibilidade de um tratamento para as matrizes analisadas, além de alta rentabilidade financeira nos processos associados à extração de compostos fenólicos.

Dias *et. al* (2022) utilizou lacase para a modificação da estrutura morfológica e disponibilização da celulose para a ação de endoglucanases e detectou uma melhora

estrutural e uma economia energética na ação destas enzimas em 42% comparando a métodos tradicionais, avaliando positivamente a adição em um sistema industrial, viabilizando a sua aplicação.

Trabalhos na literatura evidenciam que os processos enzimáticos podem ser empregados no tratamento de matrizes lignocelulósicas. Sherpa *et. al.* (2022) utilizou lacase e celulase na proporção 1:8 (v:v) gerando, em fermentação simultânea à sacarificação 7,57% de etanol (v:v de água). Shimizu *et. al.* (2020) possibilitou a redução em 15% de lignina e 10% de hemicelulose utilizando coquetel enzimático CelicCTec®, após uma deslignificação com clorito de sódio e uma conversão de 60% da celulose em açúcares redutores.

Deste modo os tratamentos compostos por lacase e celulase pode ser viabilizados, em uso simultâneo. Então, partindo do hidrolisado e das melhores condições de pH, foram adicionadas as melhores atividades enzimáticas (1,0 U mL⁻¹ de lacase e 10 FPU.mL⁻¹ de celulase) em reação de 72 horas. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Uso simultâneo de lacase e celulase comercial, utilizando as melhores condições obtidas a partir dos experimentos anteriores.

	Massa recuperada (%)	DNS (g L ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹ BS)	Lignina removida (%)
Casca de arroz	86,25 ^a ±2,84	11,35 ^a ±0,13	66,09 ^{bc} ±6,68	7,95 ^a ±0,20
Bagaço de cana	84,72 ^a ±0,79	10,41 ^b ±0,23	62,07 ^c ±6,83	8,00 ^a ±0,08
Casca de jaboticaba	88,97 ^a ±2,54	2,93 ^c ±0,02	78,47 ^b ±4,06	7,91 ^a ±0,01
Bagaço de uva	86,23 ^a ±2,03	2,92 ^c ±0,05	102,23 ^a ±4,95	7,91 ^a ±0,86

O teste de Tukey a 5% de significância foi realizado por variável em questão (colunas) para a mesma matriz e letras iguais indicam que não há diferença entre as médias de cada amostra.

Analisando os dados experimentais da Tabela 19, pode-se observar que para as matrizes casca de arroz e bagaço de cana uma maior concentração de açúcares redutores foram gerados. No entanto, o mesmo fato não foi observado para a casca de jaboticaba e para o bagaço de uva, diferindo-se significativamente pelo teste de Tukey. Ainda, a quantidade de compostos fenólicos totais obtidos da casca de

jaboticaba e o bagaço de uva foram ligeiramente superiores, conforme o teste de Tukey apontou. Por fim, o percentual de lignina removida foi semelhante, de acordo com o teste de Tukey, mas expressivamente inferiores quando comparados ao uso separado das enzimas.

Brenelli *et. al.* (2018) identificaram que o tratamento mediado por lacase foi significativamente despolimerizada a estrutura lignocelulósica, liberando compostos fenólicos e melhorando a hidrólise enzimática da celulase, quando atuando sequencialmente. Porém quando as duas enzimas atuam concomitantemente, por serem oxidases, ocorre a competição pelas moléculas de oxigênio, afetando diretamente suas velocidades de reação e assim podendo afetar o processo de conversão em açúcares redutores.

Com isso podemos avaliar que a atividade enzimática sequenciada possui maior efetividade na conversão dos açúcares redutores, conforme os dados obtidos neste trabalho. As frações dos experimentos envolvendo a maior atividade de Lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) utilizando a correção de pH e tampão acetato de sódio (pH 5,0) foram avaliadas quanto a modificação estrutural e de compostos gerados. A fração líquida foi avaliada por MIR-ATR e cromatografia (HPLC), enquanto as sólidas foram avaliadas por MIR-ATR e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.3.3. Avaliação da fração líquida

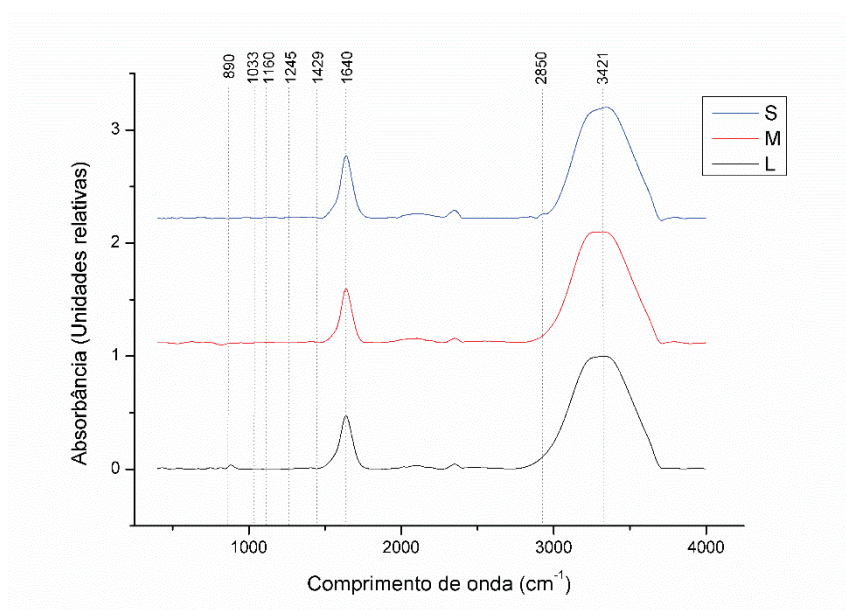
Os espectros receberam ajustes em suas linhas de base de modo a reduzir ruídos no sinal espectrofotométrico, como solventes. Seguidamente os dados foram normalizados e analisados.

Nesta etapa as triplicatas de cada amostra foram submetidas a análise experimental. A primeira (I) se refere aos obtidos após a reação alcalina (demonstrada no capítulo anterior) e utilizando o melhor caso com a enzima Lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$). A segunda (M) se refere ao extrato proveniente quando utilizadas as concentrações máximas de lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) atuando em de modo sequenciado (um após o outro). Enquanto a terceira (S) se refere ao extrato proveniente quando utilizadas as máximas concentrações de uso simultâneo. Os

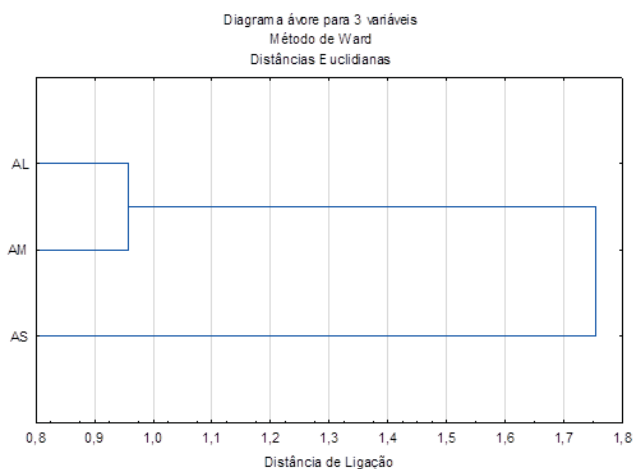
espectros foram avaliados estatisticamente utilizando o HCA. Posteriormente, os extratos líquidos foram submetidos à cromatografia, porém apenas os extratos enzimáticos (M e S) e avaliados estatisticamente utilizando o PCA. Tais resultados estão dispostos a seguir.

Avaliando os espectros obtidos partindo da casca de arroz (Figura 29) podemos concluir que os casos analisados são semelhantes entre si (distância de ligação de 1,75). Contudo o uso simultâneo das enzimas apresentou uma diferença de 0,86 para o outro grupo. Comparando com os resultados das análises de DNS e CFT (Tabelas 18 e 19) é possível notar uma diferença significativa na concentração de fenólicos, necessitando assim avaliar a cromatografia (HPLC), que será discutida posteriormente.

Figura 29. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento da casca de arroz.

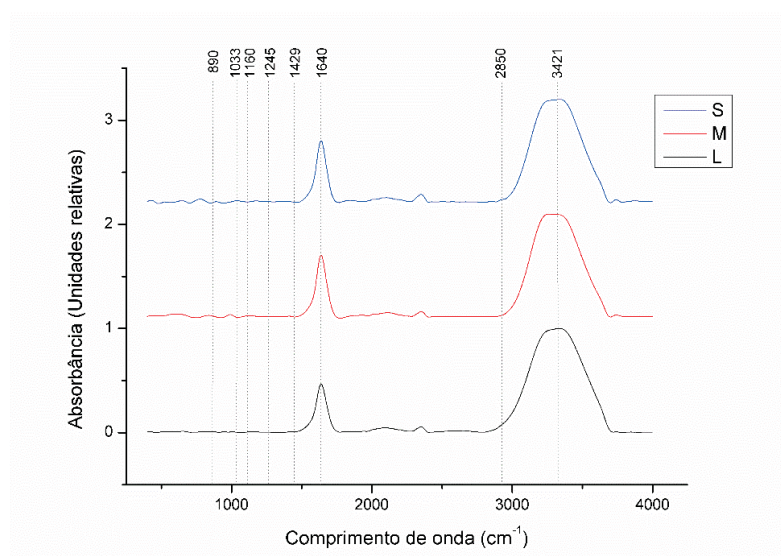


LEGENDA: L – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

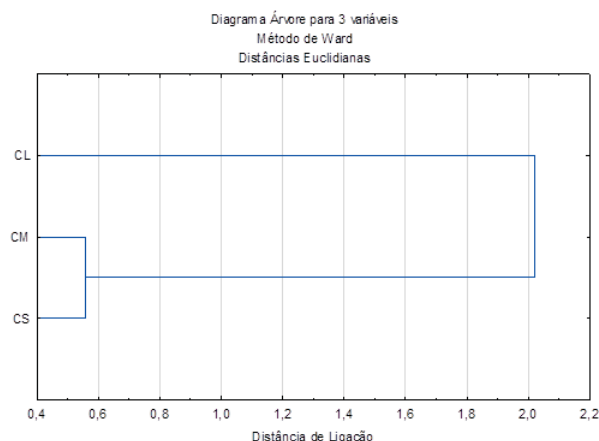
Figura 30. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a casca de arroz.

LEGENDA: AL - Tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); AM - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) isoladas; AS - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) simultaneamente.

Para o caso do bagaço de cana, ao avaliar o dendrograma (Figura 32) é possível notar uma semelhança entre os resultados proveniente do uso das duas enzimas (Lacase e celulase) combinadas ou de uso isolado. Comparando com os resultados das análises de DNS e CFT (Tabelas 18 e 19) é possível observar semelhança quanto à concentração de fenólicos, necessitando assim avaliar a cromatografia (HPLC), que será discutida posteriormente.

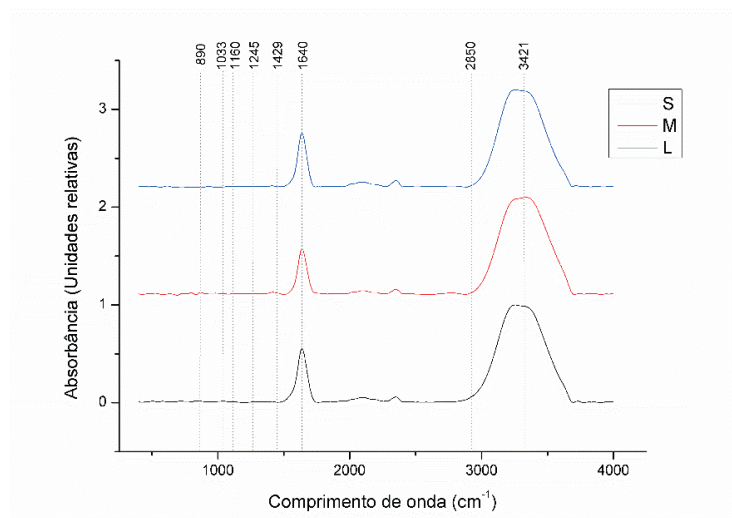
Figura 31. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento do bagaço de cana.

LEGENDA: L – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Figura 32. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a bagaço de cana

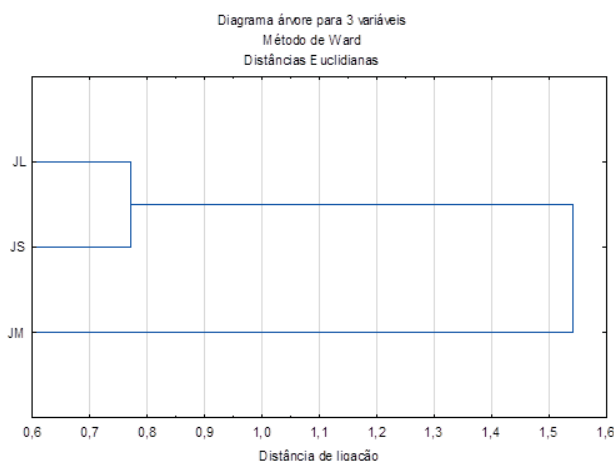
LEGENDA: CL - Tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); CM - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) isoladas; CS - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) simultaneamente.

Enquanto para o caso da casca de jaboticaba, ao avaliar o HCA (Figura 34) é possível notar uma semelhança entre os resultados proveniente do uso das duas enzimas (Lacase e celulase) combinadas com o da lacase, evidenciando uma predominância na lacase quando utilizado no simultâneo, enquanto a de uso isolado se diferencia deste grupo. Comparando com os resultados das análises de CFT (Tabelas 19 e 16) é possível notar elevados valores de o que implica em uma melhor avaliação sobre os dados que, com a análise de HPLC, será visualizada.

Figura 33- Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento da casca de jaboticaba.

LEGENDA: L – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

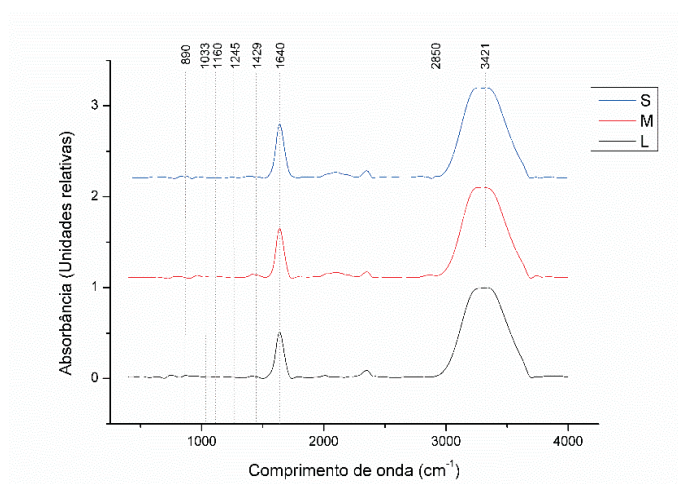
Figura 34. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a casca de jaboticaba.



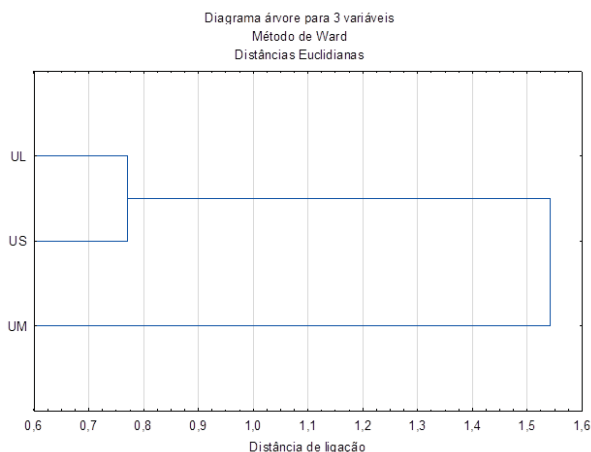
LEGENDA: JL - Tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); JM - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) isoladas; JS - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) simultaneamente.

Por fim, o bagaço de uva foi avaliado pelo HCA (Figura 36) e nele é possível notar a similaridade dos tratamentos apenas com lacase com o processo simultâneo enzimático, evidenciando uma predominância da atividade de lacase quando utilizado no simultâneo, enquanto a de uso isolado das enzimas se diferencia deste grupo. Comparando com os resultados das análises de CFT (Tabelas 19 e 16) é possível um extrato rico em fenólicos, necessitando assim de um estudo mais significativo quanto aos fenólicos presentes, com a análise de HPLC que será posteriormente discutida.

Figura 35. Espectro da fração líquida obtida ao longo do processamento do bagaço de uva.



LEGENDA: L – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Figura 36. Dendrograma obtido dos dados espectrais referentes a bagaço de uva.

LEGENDA: UL - Tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$); UM - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) isoladas; US - tratamento utilizando lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase ($10,0 \text{ FPU mL}^{-1}$) simultaneamente.

Partindo da premissa que os valores de fenólicos foram significativos em todos os casos, avaliando os espectros, a avaliação destes compostos foi realizada a fim de notar a diferença ou semelhança destes. Com isso, faz-se necessária a avaliação multivariada dos dados, de modo que todas as matrizes foram submetidas aos mesmos tratamentos enzimáticos (para esta avaliação é avaliado apenas o uso das duas enzimas, de modo combinado e de modo isolado, correspondendo assim a amostras específicas). Os dados foram auto escalados e avaliados utilizando a análise de componentes principais. Os dados experimentais obtidos estão descritos na Tabela 20.

Os dados analisados pelo PCA possuem resíduos dispersos (Figura 37-A), e os 3 PC's obtidos correspondem a 83,50% da variância dos dados. Com isso a correlação dos componentes principais 1 e 2 (Figura 37-B) com os de número 1 e 3 (Figura 37-D) demonstram a semelhança entre os experimentos 2, 8, 6 e 4 (uso isolado das enzimas para a casca de arroz, bagaço de uva, casca de jaboticaba e bagaço de cana, respectivamente), enquanto as demais amostras se diferem entre si e do mencionado grupo. Analisando os *loadings* de cada *score* anteriormente citados, é notável que a porção positiva de PC1 são regidas principalmente pelas variáveis 5 (Ácido clorogênico), 9 (Ácido sirínico) e 10 (Ácido p-cumárico) e observadas para o caso das amostras 1, 3, 5 e 7 (uso combinado das enzimas ante casca de arroz, bagaço de cana, casca de jaboticaba e bagaço de uva), enquanto na sua porção negativa, que se refere às amostras com uso isolado das enzimas, as variáveis de maior

significância são 1 (Quercetina-3) e 12 (Naringina). A porção negativa se difere significativamente da porção positiva. Avaliando PC2, observa-se que as amostras 3 e 4 (uso simultâneo e isolado das enzimas para o bagaço de cana) se assemelham entre si na porção negativa de PC2 e esta porção é regida pelas variáveis 7 (Ácido cafeico) e 10 (Ácido cumárico), se assemelhando entre si e se distinguindo das demais que estão na porção positiva de PC2, que acumula primordialmente informações ante as variáveis 15 (Cianidina) e 9 (Ácido siringico). Como a cianidina não foi detectada em nenhum caso, vale destaque para a próxima variável influente que é a 4 (Ácido gálico) demonstrando assim similaridades das amostras para tais variáveis.

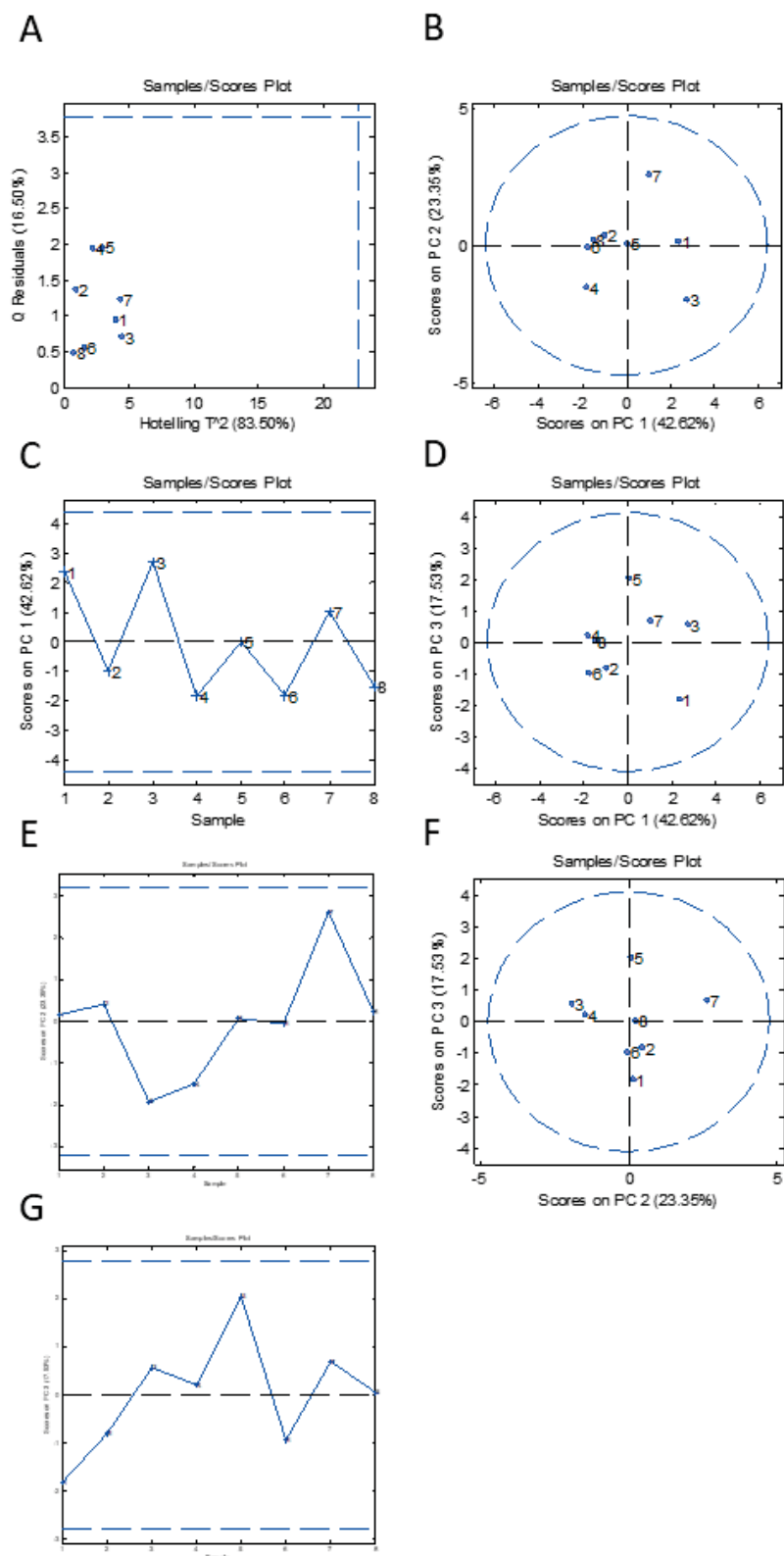
Tabela 20. Concentração de compostos fenólicos (mg L⁻¹) obtida pela análise utilizando HPLC.

Número da amostra			Tratamento enzimático															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Código da variável	-	-																
Casca de arroz	1	Simultâneo*	<LQ	<LQ	<LQ	0,360	0,595	<LQ	<LQ	<LQ	3,790	2,170	<LQ	0,650	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	2	Isolado**	4,855	<LQ	<LQ	0,815	0,365	<LQ	<LQ	<LQ	1,065	0,345	<LQ	1,760	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Bagaço de cana	3	Simultâneo*	0,510	<LQ	<LQ	1,075	0,42	<LQ	0,43	<LQ	1,570	4,955	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	4	Isolado**	2,760	<LQ	<LQ	0,555	<LQ	<LQ	0,47	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,145	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Casca de jaboticaba	5	Simultâneo*	<LQ	<LQ	<LQ	1,565	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,430	<LQ	<LQ	0,780	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	6	Isolado**	4,185	<LQ	<LQ	0,260	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,890	<LQ	<LQ	1,70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Bagaço de uva	7	Simultâneo*	2,480	<LQ	<LQ	1,390	0,345	<LQ	<LQ	<LQ	2,930	<LQ	<LQ	0,985	<LQ	<LQ	1,665	<LQ
	8	Isolado**	4,260	<LQ	<LQ	0,855	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,835	<LQ	<LQ	1,52	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

NOTA: * Uso de Lacase (1,0 U mL⁻¹) seguido de inativação e uso de celulase (10,0 FPU mL⁻¹); ** Uso de Lacase (1,0 U mL⁻¹) e celulase (10,0 FPU mL⁻¹) concomitantemente.

LEGENDA: <LQ – Abaixo do limite de quantificação da curva padrão;

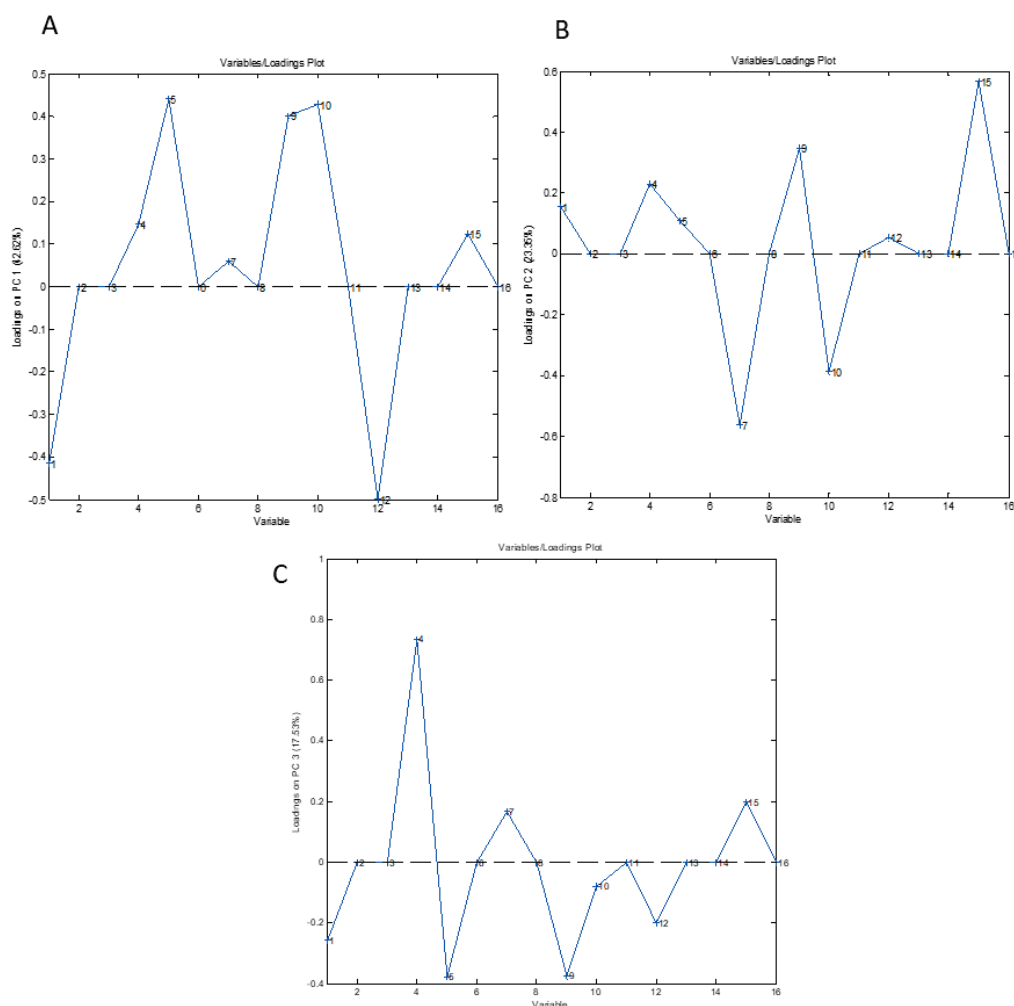
Figura 37. Scores e componentes principais referente aos dados obtidos pela análise de HPLC.



LEGENDA: Cada matriz foi submetida a tratamento do uso isolado (M) de cada enzima e simultâneo (S). 1- Casca de arroz S; 2- Casca de arroz M; 3- Bagaço de cana S; 4- Bagaço de cana M; 5- Casca de jaboticaba S; 6- Casca de jaboticaba M; 7- Bagaço de uva S; 8- Bagaço de uva M.

A combinação dos componentes principais 1 e 3 apresentaram um aspecto considerável ante a distinção das variáveis. Conforme mencionado anteriormente quanto ao PC1 e PC2, o mesmo referido quanto ao PC1 é observado nesta combinação, contudo a combinação com PC3 apresenta a distinção das variáveis de um modo distinto. Neste caso é possível notar que a variável 1 se difere significativamente na porção positiva de PC3, onde é significativamente expressivo a concentração de ácido gálico (variável 4) presente na amostra, fazendo com que as amostras 1, 2 e 6 (respectivamente casca de arroz no uso simultâneo e isolado das enzimas, jaboticaba no uso isolado das enzimas) se diferenciem das demais.

Figura 38. Análise de *loadings* de cada componente principal ao longo das variáveis analisadas.



LEGENDA: (1) Quercetina 3; (2) Ácido elágico; (3) Quercetina; (4) Ácido gálico; (5) Ácido clorogênico; (6) Ácido vanílico; (7) Ácido cafeico; (8) Epicatequina; (9) Ácido siríngico; (10) Ácido p-cumárico; (11) Ácido ferúlico; (12) Naringina; (13) Ácido trans-cinâmico; (14) Catequina; (15) Procianidina B2; (16) Cianidina.

Um estudo envolvendo lacase extracelular produzida por *Yarrowia lipolytica* foi capaz de oxidar compostos fenólicos sobre a palha de arroz além de demonstrar uma elevada capacidade de remoção de inibidores da celulase sobre a matriz tratada, gerando compostos fenólicos livres (LEE *et. al.*, 2012). Tišma *et. al.* (2018) utilizou *Trametes versicolor* para a produção de lacases sobre um subproduto sólido da indústria cervejeira e observou um aumento de 3,4 vezes da composição fenólica e uma atividade enzimática de 560 UL⁻¹ após 4 dias de fermentação.

Com isso podemos concluir, após a análise detalhada do PCA e a comparação de dados da literatura, que o tratamento enzimático demonstrou elevada capacidade de obtenção do ácido gálico e os demais fenólicos, sendo exclusivamente dependente da matriz a qual o tratamento será aplicado. Por mais que o tratamento enzimático apresentou tais resultados positivos, vale destacar que o tratamento químico e físico (tratado neste trabalho) apresentou valores significativamente superior quanto a concentração dos compostos fenólicos aqui demonstrados. Cabe destacar ainda que a ação das enzimas influenciada significativamente dependendo de seu uso, podendo afetar diretamente a produção dos açúcares redutores, por interferência da lacase sobre a celulase ou a presença de co-produtos da lignina, como os compostos fenólicos. Contudo, fica uma evidência sobre a redução do montante de ácido gálico disponível no extrato. Observa-se que nos casos do bagaço de cana de açúcar, casca de jaboticaba e bagaço de uva a redução da concentração de ácido gálico por parte da ação da lacase isolada seguida do uso de lacase gerou uma maior quantidade de açúcares redutores disponibilizadas para a produção de etanol de segunda geração em uma possível aplicação de sistemas de biorrefinaria.

4.3.4. Avaliação da fração sólida

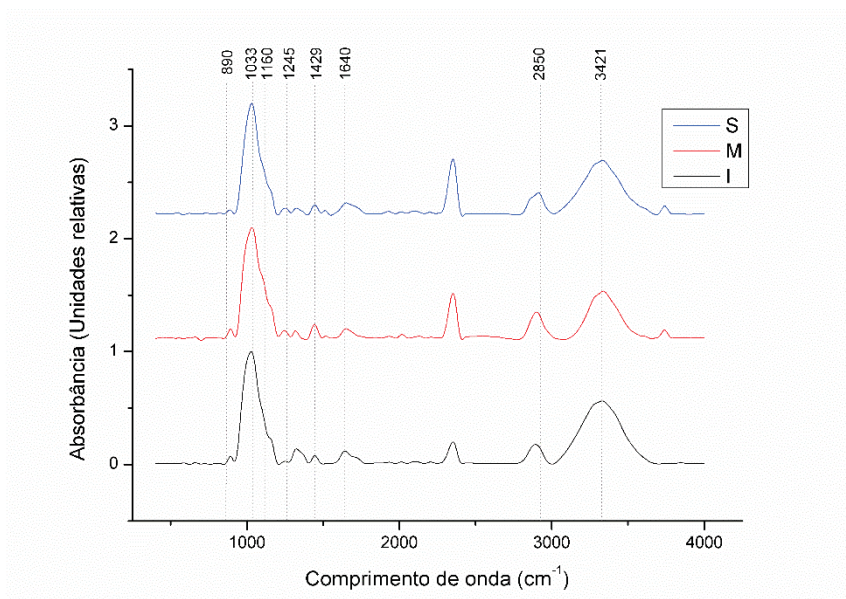
A fração sólida amostral foi avaliada quanto a espectroscopia MIR-ATR (Figuras 39 a 42) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A análise espectral foi realizada utilizando a ferramenta PCA, para agrupar ou distinguir amostras quanto a suas características espectrais. Os dados foram tratados, ajustados as linhas de base e normalizados. Com isso eles foram adicionados à matriz de dados, auto escalados e analisados utilizando o MatLab®.

Os dados foram representados pelos três componentes principais em 74,10% da variância dos dados. O PC 1 (39,09% da variância) foi avaliado com PC2 (21,73% da variância) e nele podemos notar a distinção ante as matrizes analisadas (Figura 43-B). Analisando pela combinação de efeitos na mesma matriz: **(1)** Para a casca de arroz: o experimento 1, se difere significativamente dos experimentos 2 e 3, devido às informações dos comprimentos de onda (Figura 44-A e 44-B) que se referem a modificação da lignina (2850 cm^{-1} e 1640 cm^{-1}) em PC1 e PC2 (3421 cm^{-1} e 1245 cm^{-1}). O mesmo fato observado em PC1 é observado analisando PC3. Com isso, pode-se concluir que o tratamento da lacase foi eficiente exatamente na lignina enquanto os demais abrangeram além da celulose (890 cm^{-1} e 1033 cm^{-1}); **(2)** Para o bagaço de cana: os experimentos 4, 5 e 6 são semelhantes entre si e o experimento 5 possui uma pequena diferença do 4 e 6 em todos os PC's, principalmente quanto aos comprimentos de onda 1033 cm^{-1} e 1245 cm^{-1} , evidenciando que o tratamento utilizando a celulase posterior a lacase foi responsável em uma maior modificação estrutural; **(3)** Para a casca de jaboticaba: os experimentos 7, 8 e 9 se diferem significativamente em PC3, onde a porção positiva é relacionada com o comprimento de onda 1640 e 2850 cm^{-1} , que corresponde à lignina. Em PC1, observa-se a diferenciação dos experimentos 7 e 9 do experimento 8, onde a fração de celulose (890 cm^{-1}) é a principal responsável pela diferenciação, deixando evidenciado que a atividade da celulase no caso do experimento 9 foi afetado pela ação da lacase ou pelos compostos liberados pela lacase em sua reação; **(4)** Para o bagaço de uva: os experimentos 10, 11 e 12 são semelhantes entre si e o experimento 11 possui uma pequena diferença do 10 e 12 em todos os PC's, principalmente quanto aos comprimentos de onda 1033 cm^{-1} para PC2 e PC3 em sua porção positiva, evidenciando que o tratamento utilizando a celulase posterior a lacase apresentou maior ação sobre a estrutura;

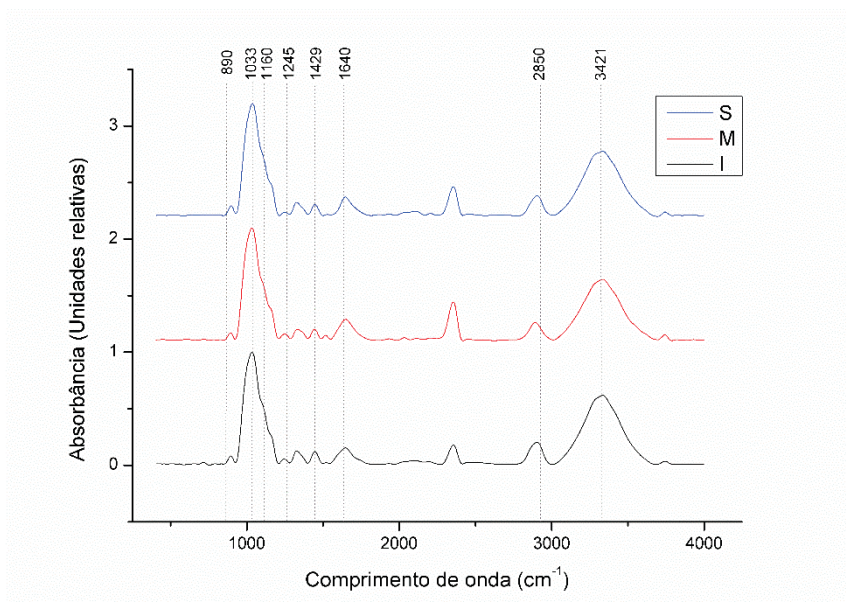
Deste modo é observado que o mesmo resultado apresentado para a fração líquida foi apreciado na fração sólida, onde o uso das enzimas lacase e celulase utilizadas de modo sequenciado demonstrou menor efetividade de conversão em açúcares, mas seu uso individualizado favoreceu significativamente para este produto.

Figura 39. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento da casca de arroz.



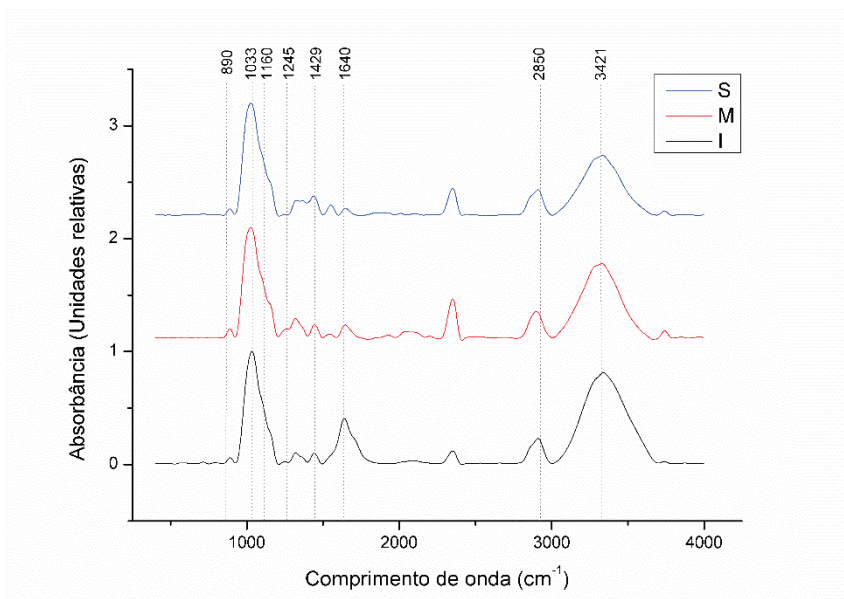
LEGENDA: I – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase $1,0 \text{ U mL}^{-1}$; M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Figura 40. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento do bagaço de cana.



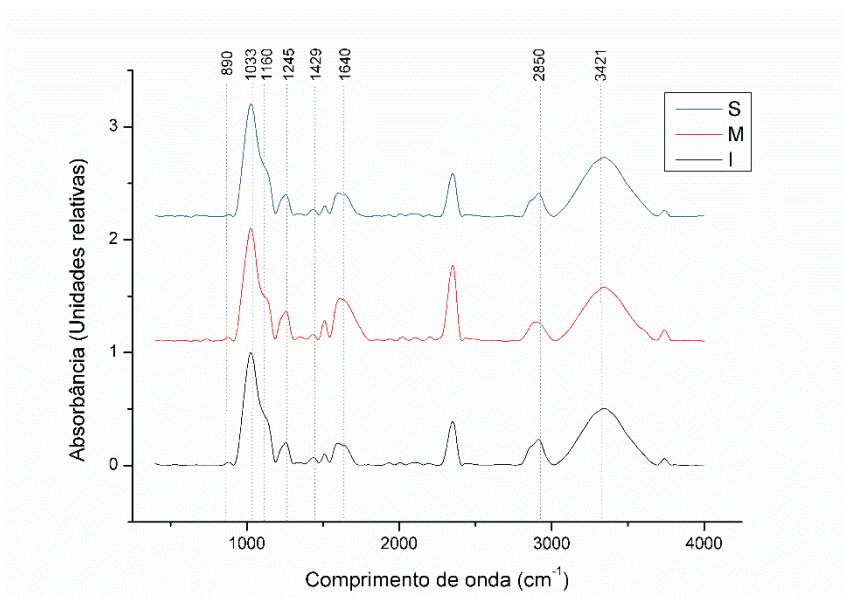
LEGENDA: I – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase $1,0 \text{ U mL}^{-1}$; M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas em duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Figura 41. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento da casca de jaboticaba.



LEGENDA: I – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase $1,0 \text{ U mL}^{-1}$; M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Figura 42. Espectro da fração sólida obtida ao longo do processamento do bagaço de uva.



LEGENDA: I – Matriz obtida após o tratamento utilizando lacase $1,0 \text{ U mL}^{-1}$; M- Matriz após o tratamento enzimático em sua concentração máxima nas duas reações; S- Matriz obtida após o tratamento enzimático simultâneo.

Com isso faz-se necessário a avaliação da real modificação das matrizes utilizando a microscopia eletrônica de varredura no comparativo pré e pós a reação

enzimática para o melhor caso (Celulase com 10 FPU mL⁻¹ e lacase com 1 U mL⁻¹ com reação individualizada e sequencial). Os resultados estão expressos nas Figuras 45 e 46.

Ao avaliar caso a caso, podemos notar que: (1) para a casca de arroz (Figuras 45-A e 45-B) e também para o bagaço de cana (Figuras 45-C e 45-D) a modificação estrutural é notada pela modificação dos dutos em meio a estrutura, evidenciando a liberação de compostos provenientes da ação enzimática sobre a matriz, conforme analisado anteriormente; (2) para a casca de jaboticaba (Figuras 46-A e 46-B) e para o bagaço de uva (Figuras 46-C e 46-D) a matriz sofreu modificações estruturais pequenas e também é observado o surgimento de pequenos dutos para o bagaço de uva. Com isso podemos avaliar que a modificação estrutural e liberação de compostos, apontada pelas análises estatísticas, é corroborada ao avaliar as imagens obtidas pela MEV.

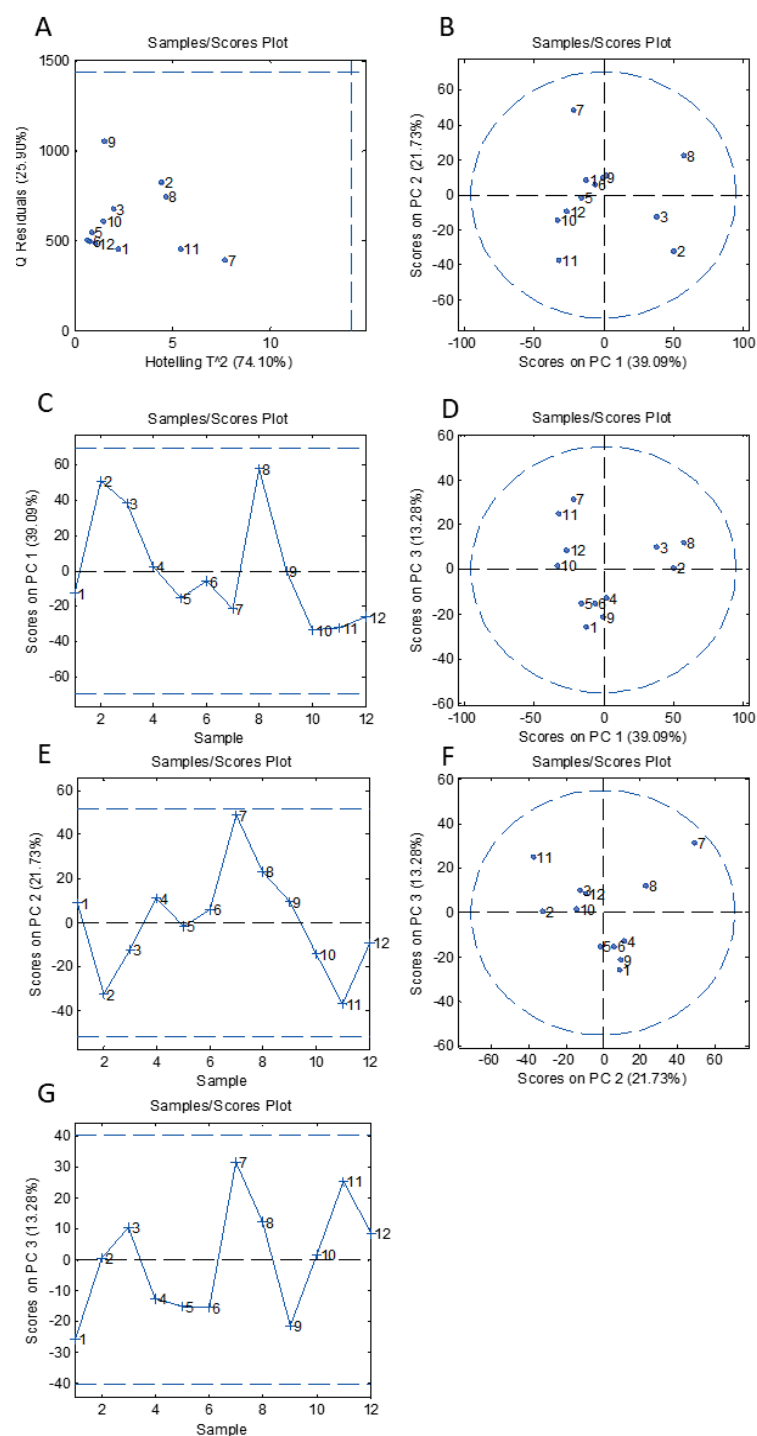
Rattanawongwiboon *et. al.* (2022) obteve, utilizando um catalizador ácido verde sobre a matriz de bagaço de cana, uma elevação do percentual de celulose e uma matriz seguidamente transformada em biocarvão com características similares às obtidas em nosso trabalho quando observadas as características morfológicas da matriz em questão. Com isso, pode-se avaliar o uso desta matriz residual em estudos futuros, utilizando integralmente a matriz para a obtenção de produtos de interesse comercial.

Outra perspectiva quanto ao uso dos residuais processuais é a incorporação de biofilmes, como o demonstrado por Chi *et. al.* (2020). Neste estudo ele demonstrou que frações do bagaço de uva podem formar um biofilme robusto com k-carragenina e hidroxipropilmetilcelulose de modo a indicar as características sensoriais atuais de alimentos como a carne suína, avaliando seu pH pela sensibilidade do filme aplicado. Este caso pode ser incorporado também como alternativa ao uso do extrato final residual de matrizes como o bagaço de uva.

Além de tais perspectivas, observa-se que ainda existe um percentual elevado das concentrações de lignina presentes na matriz final, assim como as de celulose (indiretamente pela avaliação dos espectros). Alternativamente a isso, a matriz pode ser submetida ao tratamento para uma nova extração de compostos fenólicos, seguido da obtenção de açúcares fermentescíveis, seja em um novo ciclo ou refluxo do residual para o início do processo, indicando a viabilidade de um tratamento

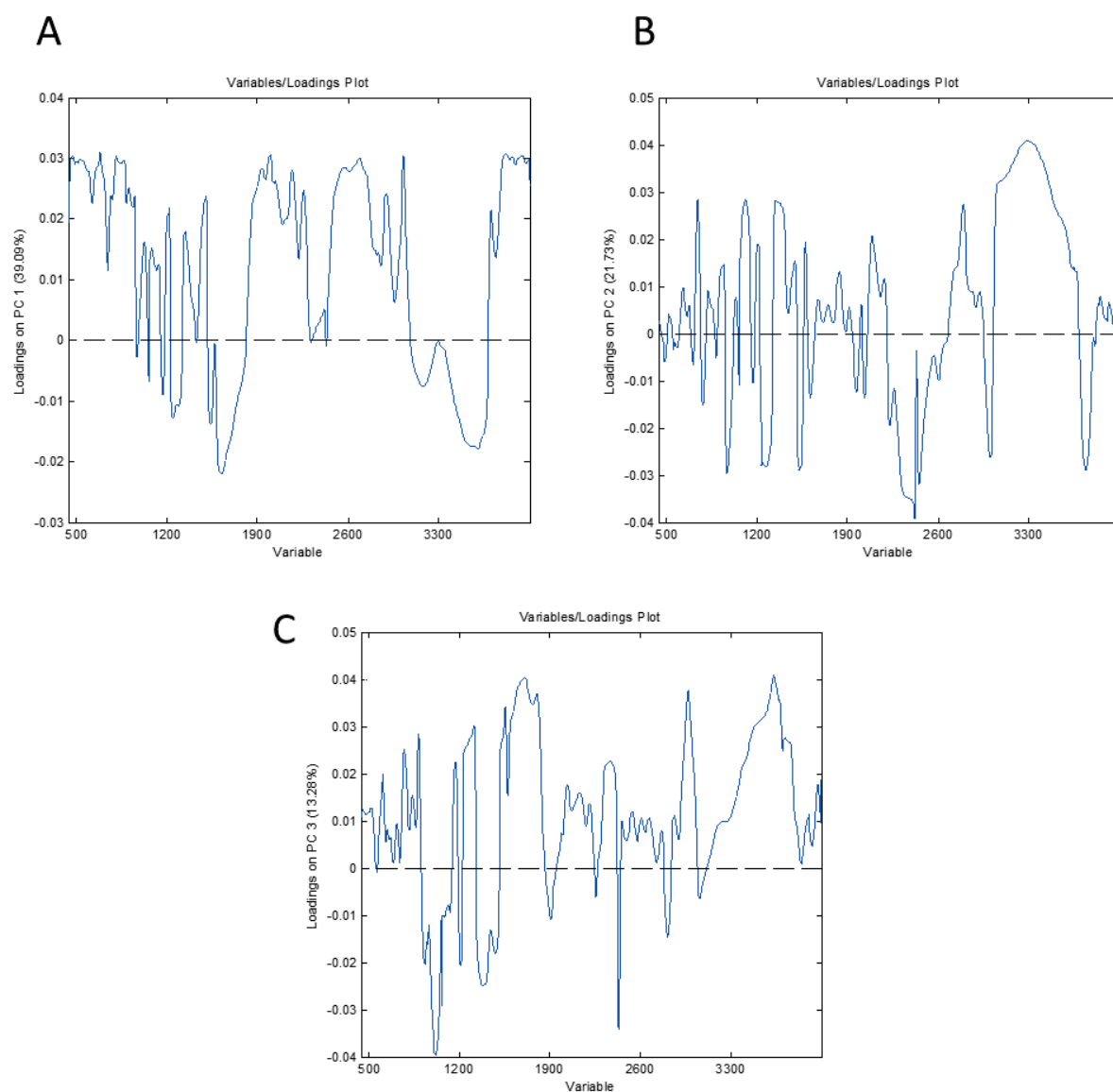
complexo, mas provável para a obtenção da redução de sólidos e a obtenção de novos produtos.

Figura 43. Scores e componentes principais referente aos dados obtidos pela análise MIR-ATR.



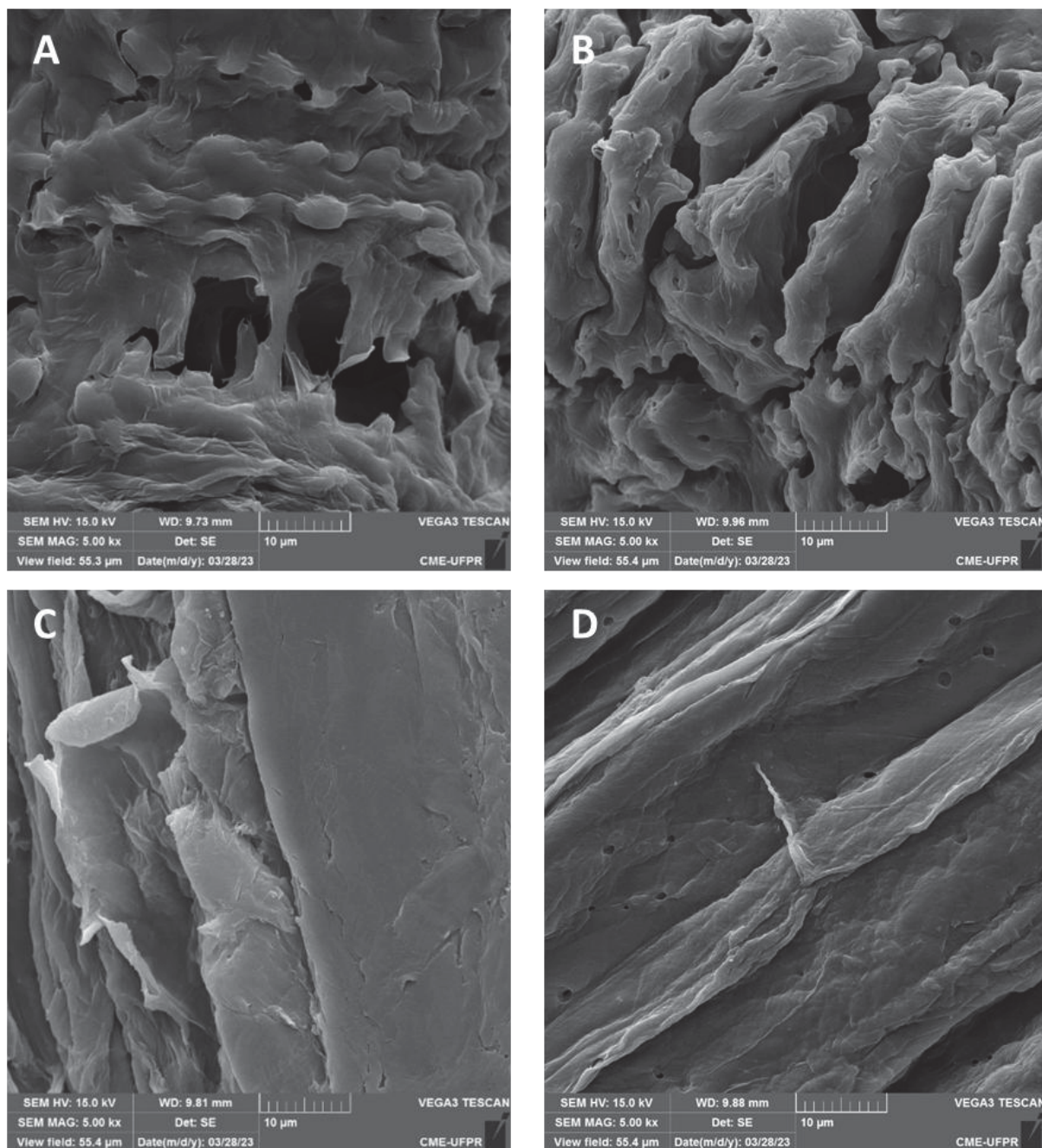
LEGENDA: Cada matriz foi submetida a tratamento utilizando Lacase (I), uso isolado (M) de cada enzima e simultâneo (S). 1- Casca de arroz I; 2- Casca de arroz M; 3- Casca de arroz S; 4-Bagaço de cana I; 5- Bagaço de cana M; 6- Bagaço de cana S; 7- Casca de jaboticaba I; 8- Casca de jaboticaba M; 9- Casca de jaboticaba S; 10- Bagaço de uva I; 11- Bagaço de uva M; 12- Bagaço de uva S.

Figura 44. Análise de *loadings* de cada componente principal ao longo das variáveis analisadas (Comprimento de onda em cm^{-1}).



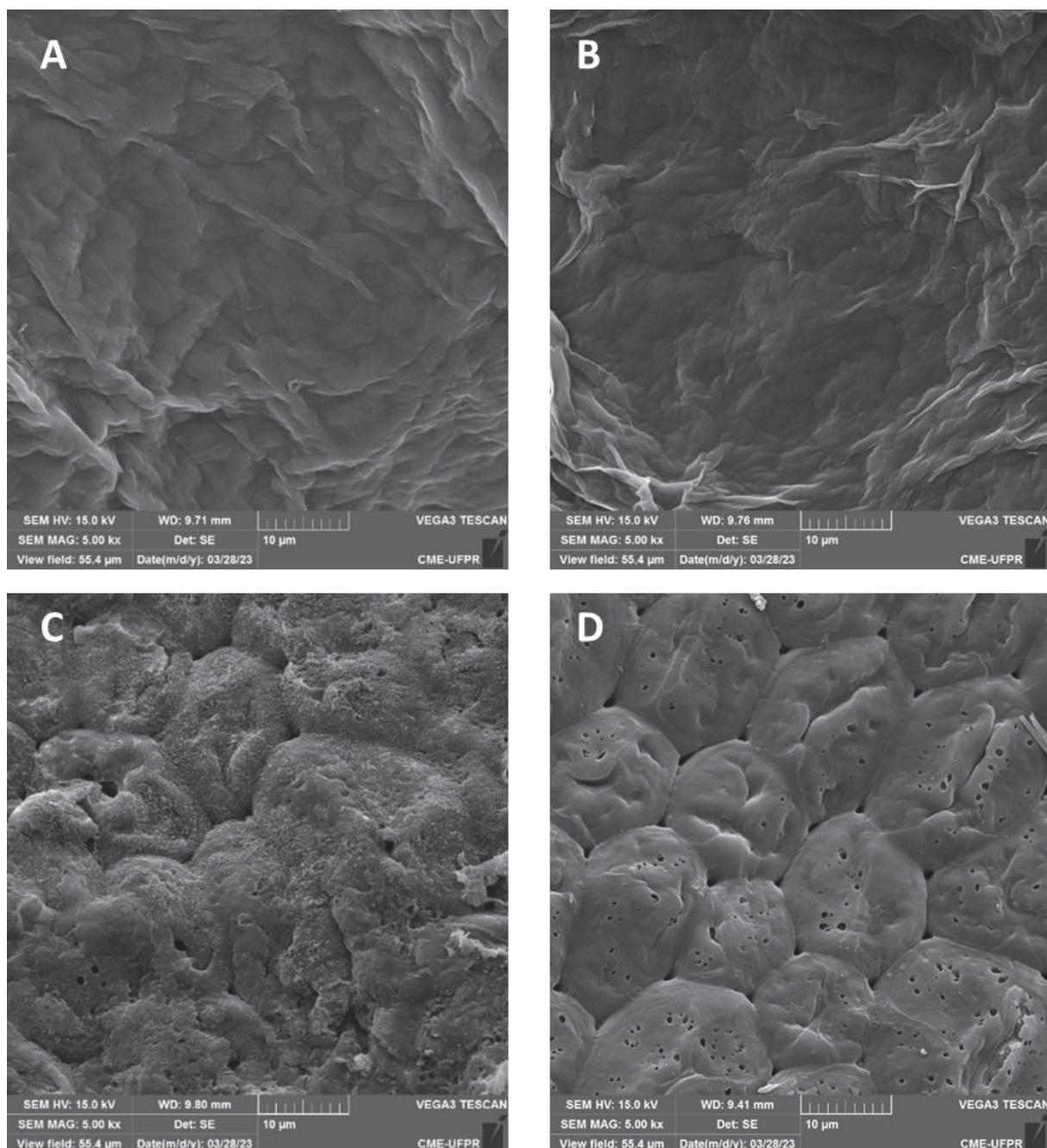
LEGENDA: As variáveis identificadas numericamente se referem aos comprimentos de ondas obtidos nos espectros MIR-ATR.

Figura 45. Imagens obtidas por MEV das matrizes após tratamento químico (à esquerda) e após tratamento enzimático (à direita) para a casca de arroz e bagaço de cana.



LEGENDA: A- Casca de arroz (após tratamento químico); B- Casca de arroz (após tratamento enzimático); C- Bagaço de cana (após tratamento químico); D- Bagaço de cana (após tratamento enzimático).

Figura 46. Imagens obtidas por MEV das matrizes após tratamento químico (à esquerda) e após tratamento enzimático (à direita) para a casca de jaboticaba e bagaço de uva.



LEGENDA: A- Casca de jaboticaba (após tratamento químico); B- Casca de jaboticaba (após tratamento enzimático); C- Bagaço de uva (após tratamento químico); D- Bagaço de uva (após tratamento enzimático).

4.4. CONCLUSÃO PARCIAL

Ao avaliar as reações de cada tratamento utilizando a lacase, pode-se notar um aumento da remoção de lignina, porém não observado a mesma proporcionalidade ante a concentração de compostos fenólicos totais dentre as amostras. Em todos os experimentos foram observados que a lignina foi removida em maior quantidade com o ajuste de pH, seguido de tamponamento e utilizando mais unidades de lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) com uma redução variando de 34,49 a 39,67%. Seguidamente a combinação do uso sequencial de lacase e celulase foi avaliado e para todos os casos a geração de açúcares redutores (DNS) de maior significância obtido foi utilizando $1,0 \text{ U mL}^{-1}$ de lacase e 10 FPU mL^{-1} de celulase, obtendo de 11,19 a $12,44 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares disponíveis. Comparativamente o uso combinado das unidades de lacase e celulase apresentaram resultados significativamente menores quanto a formação de açúcares redutores comparados aos de uso isolado, evidenciando o disposto na literatura quanto a inviabilidade ocasional do uso combinado ante a diversificação condicional de cada caso. O melhor caso obtido neste estudo, é referente ao uso de lacase e celulase sequenciadas ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$ e 10 FPU mL^{-1} respectivamente). Tal caso apresentou resultados médios de 27,52% de lignina removida e uma geração média de $64,92 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ BS}$ e $12,07 \text{ g L}^{-1}$ em um percentual recuperado médio de 66,44% de massa.

Deste modo as frações líquidas com tratamento simultâneo, avaliando seus espectros, se diferenciam dos obtidos na ação sequenciada nos casos do bagaço de cana, casca de jaboticaba e bagaço de uva. Para a casca de arroz a diferenciação é menor, mas ainda presente. A pequena concentração fenólica é notada ao avaliar o cromatograma, tendo destaque a concentração de ácido gálico (para as matrizes casca de arroz e casca de jaboticaba) ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido p-cumárico (todas as amostras).

Com isso, as frações sólidas analisadas demonstraram que a celulase apresentou maior diferenciação espectral quando comparado a ação simultânea e sequenciada de lacase, evidenciando que o uso das duas enzimas apresenta resultados com maior compatibilidade com a celulose (1033 cm^{-1}). A modificação estrutural, evidenciada pelo PCA é comprovada avaliando as MEV's, que demonstram tal ação.

Deste modo a variabilidade das matrizes pode ser minimizada quando os processos utilizados são otimizados e positivamente avaliados quando sequenciados, apresentando resultados satisfatórios para uma viabilização comercial. Alternativamente a isso, a incorporação de processos ou processamentos da matriz quanto ao uso do residual sólido para a obtenção de outros produtos, como biocarvões, biofilmes ou refluxo dos residuais reacionais ao início do tratamento ou um novo ciclo de tratamentos ácidos e enzimáticos, se mostram como alternativas para a viabilização de um sistema completo de biorrefinaria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de biorrefinaria de fase III vem sendo foco de estudos no uso de substratos não convencionais. Tratamentos biológicos são os de grande visibilidade na comunidade e vem apresentando resultados significativos quando comparados a outros tratamentos, possuindo menor custo (operacional e de aquisição) e uma maior variabilidade ante as matrizes. Com isso as matrizes são o foco inicial de todo e qualquer processo a ser considerado global.

As matrizes escolhidas neste trabalho possuem características distintas entre si, tanto aos percentuais de lignina (com variabilidade de 11,92 a 20,96%) quanto de carboidratos (59,05 a 70,08%). Isso é comprovado diretamente na divergência espectral observada quanto aos seus constituintes base (lignina, celulose e hemicelulose), representando grande parte das matrizes a serem utilizadas neste possível tratamento global.

Diante os tratamentos evidenciados na literatura, e estudados neste trabalho, estruturam que os do tipo químico e físico são os de melhores preparos para a ação do tratamento biológico. Com isso o tratamento alcalino, demonstrou a possibilidade de obter elevadas concentrações de compostos fenólicos (de 522,19 a 617,78 mg EAG g⁻¹ BS) e uma baixa inferência sobre a celulose (2,35 a 9,11 g L⁻¹) quando comparados aos tratamentos ácidos. Tal tratamento sobre as matrizes estudadas proporcionou a redução da massa residual inicial (32,81 a 66,89 gramas a cada 100 gramas de amostra) e uma redução média de lignina (2,75%). Mediante tais evidências quanto a obtenção de compostos fenólicos, fez-se necessária a quantificação deste utilizando o HPLC. Nesta análise compostos distintos foram obtidos nas matrizes: o bagaço de uva foi a melhor fonte de ácido gálico, epicatequina e procianidina B2, enquanto para a casca de arroz apresentou as maiores concentrações de quercetina-3, ácido elágico, ácido caféico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, naringina e catequina. Enquanto o bagaço de cana liberou as maiores concentrações de ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido trans-cinâmico. Tais dados reforçam a importância desta etapa em um possível sistema de biorrefinaria, visto que seus valores comerciais são elevados.

Outro fato observado no tratamento alcalino junto à elevação de temperatura é a equiparação ante o mesmo tratamento variando as matrizes, obtendo assim uma

distinção quando comparados os espectros de tais frações sólidas. Tal fato é evidenciado quando avaliado a MEV de cada matriz, de modo comparativo à mesma in natura, proporcionando uma modificação estrutural significativa, favorecendo a desestabilização estrutural e preparando a matriz para a ação de tratamentos biológicos, buscando a minimização de uso de processos agressivos e se valorizando ao apelo global por tecnologias “verdes”, como é o caso do tratamento biológico.

No tratamento biológico é notável que ambas as enzimas possuem maior atividade quando submetidas a uma correção de pH e a manutenção deste por uso de tampão. O tratamento sequencial com lacase ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$) e celulase (10 FPU mL^{-1}) foi capaz de reacionar em média 27,52% da lignina presente após o tratamento alcalino e 25,08% da massa total média das matrizes, gerando $64,92 \text{ mg EAG g BS}^{-1}$ e $12,07 \text{ g L}^{-1}$ de CFT e açúcares redutores, respectivamente. Destes fenólicos se destacam ácido gálico (para os casos da casca de arroz e casca de jaboticaba) ácido clorogênico, ácido siríngico e ácido p-cumárico (em todas as amostras). As modificações estruturais demonstram que o uso sequencial de lacase e celulase foram de maior eficiência quando comparado ao uso apenas de lacase e ao uso de lacase e celulase simultâneos, constatadas nas imagens da MEV.

Por fim, vale o destaque da viabilidade do bioprocesso evidenciado ante os compostos obtidos. Devido ao alto valor comercial dos fenólicos, como ácido elágico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico e procianidina, a biorrefinaria se torna uma alternativa viável economicamente e com grande potencial de implantação, gerando alta rentabilidade e sustentabilidade processual, uma vez que são processos simples e com grande potencial de aplicação em matrizes com distintas constituições, como os resíduos provenientes da cana de açúcar, casca de arroz, bagaço de uva e casca de jaboticaba. Alta diversidade de aplicação, alta rentabilidade e inúmeras possibilidades diante a sequência de tratamentos menos complexa e possível se tornar produtos com alta aplicabilidade industrial.

REFERÊNCIAS

ABAIDE, Ederson R. *et al.* Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 272, n. October 2018, p. 510–520, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.075>

ABDI, Hervé; WILLIAMS, Lynne J. Pairwise Comparisons. *In: Encyclopedia of Research Design*. [S. l.: s. n.]. p. 1–11. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1137/1.9781611971576.ch4>

ADAMI, Renata *et al.* Supercritical Antisolvent Technique for the Production of Breathable Naringin Powder. **Pharmaceutics** 2022, Vol. 14, Page 1623, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1623, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14081623>. Acesso em: 16 mar. 2023.

AGRAWAL, Dhruv *et al.* An innovative approach of priming lignocellulosics with lytic polysaccharide mono-oxygenases prior to saccharification with glycosyl hydrolases can economize second generation ethanol process. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 308, n. January, p. 123257, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123257>

AGUILAR, R. *et al.* Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00106-1)

ALBUQUERQUE, Bianca R. *et al.* Jabuticaba residues (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 309, n. June 2019, p. 125735, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125735>

ALDRICH, Catalog. **Sigma-aldrich**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cen-v079n041.p017>.

ALMEIDA, Luciana Gomes Fonseca de *et al.* Composition and growth of sorghum biomass genotypes for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 122, n. January, p. 343–348, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.030>

ALOKIKA *et al.* Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological**

Macromolecules, [S. l.], v. 169, p. 564–582, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175>

ALTUNBAS, Osman; OZDAS, Ayse; YILMAZ, M. Deniz. Luminescent detection of Ochratoxin A using terbium chelated mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 382, n. August 2019, p. 121049, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121049>

ALVES DE OLIVEIRA, Regiane *et al.* Current Advances in Separation and Purification of Second-Generation Lactic Acid. **Separation and Purification Reviews**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 159–175, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1590412>

ALVES, Sérgio L. *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 336–349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>

ARAGÃO, Moniky S. *et al.* Mycoremediation of vinasse by surface response methodology and preliminary studies in air-lift bioreactors. **Chemosphere**, [S. l.], v. 244, p. 125432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125432>

ARAÚJO, Frederico A. Dantas de. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. **Revista Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 01, n. 081, p. 1–6, 2007.

ARSHAD, Muhammad; FRANKENBERGER, William T. Ethylene in Agriculture: Synthetic and Natural Sources and Applications. *In: Ethylene*. [S. l.]: Springer US, 2002. p. 289–335. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0675-1_8

ARUWAJOYE, Gabriel S.; SEWSYNKER-SUKAI, Y.; KANA, E. B. Guegui. Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and preliminary scale up. **Fuel**, [S. l.], v. 278, n. June, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118351>

ASKARULY, Kydyr *et al.* Obtaining and characterization of amorphous silica from rice husk. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 88–97, 2020.

ASTOLFI, V. *et al.* Sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais pelo extrato enzimático bruto produzido por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja. [S. l.], p. 1209–1214, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeqic2015-178-32692-248839>

ATATOPRAK, Tuğba *et al.* Grape stalk valorization for fermentation purposes. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [S. l.], v. 4, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100067>

BAIG, Mutawara Mahmood; GUL, Iftikhar Hussain. Conversion of wheat husk to high surface area activated carbon for energy storage in high-performance supercapacitors. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 144, n. December 2020, p. 105909, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105909>

BAKER, Paul W. *et al.* Pre-processing Waste Tomatoes into Separated Streams with the Intention of Recovering Protein: Towards an Integrated Fruit and Vegetable Biorefinery Approach to Waste Minimization. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 3463–3473, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01748-3>

BAKSI, Sibashish *et al.* Valorization of Lignocellulosic Waste (*Crotalaria juncea*) Using Alkaline Peroxide Pretreatment under Different Process Conditions: An Optimization Study on Separation of Lignin, Cellulose, and Hemicellulose. **Journal of Natural Fibers**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 662–676, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15440478.2018.1431998>

BALA, Anju; SINGH, Bijender. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 130, p. 12–24, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.033>

BANERJEE, Shivali *et al.* Integrated Biorefinery Strategy for Valorization of Pineapple Processing Waste into High-Value Products. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 631–643, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01542-7>

BAPTISTA, Sara L. *et al.* Multi-feedstock biorefinery concept: Valorization of winery wastes by engineered yeast. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 326, n. PA, p. 116623, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116623>

BECHARA, Rami *et al.* Review of design works for the conversion of sugarcane to first and second-generation ethanol and electricity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 91, n. January 2017, p. 152–164, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.020>

BENOUADAH, Nacera *et al.* Analysis of extractives from *Pinus halepensis* and *Eucalyptus camaldulensis* as predominant trees in Algeria. **Holzforschung**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 97–104, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0098>

BERES, Carolina *et al.* **Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review**. [S. l.]: Pergamon, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>

BHATIA, Shashi Kant *et al.* Bioconversion of barley straw lignin into biodiesel using *Rhodococcus* sp. YHY01. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 289, n. May, p. 121704, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121704>

BOBOESCU, Iulian Zoltan *et al.* High-efficiency second generation ethanol from the hemicellulosic fraction of softwood chips mixed with construction and demolition residues. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 266, p. 421–430, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.056>

BONANNO, Alessandro; CAVALCANTI, Josefa Salete Barbosa. Globalization, Food Quality and Labor: The Case of Grape Production in North-Eastern Brazil. **International Journal of Sociology of Agriculture and Food**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 37–55, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.48416/IJSAF.V19I1.235>. Acesso em: 10 mar. 2023.

BORDONAL, Ricardo de Oliveira *et al.* Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 38, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>

BRADU, Pragya *et al.* Environmental Science and Pollution Research Recent advances in green technology and Industrial Revolution 4.0 for a sustainable future. [S. l.], v. 1, p. 3, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20024-4>. Acesso em: 1 nov. 2023.

BRAR, Kamalpreet Kaur *et al.* A paradigm shift towards production of sustainable bioenergy and advanced products from Cannabis/hemp biomass in Canada. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02570-6>

BRAUTASET, Trygve; ELLINGSEN, Trond E.; EGGELING, Lothar. Lysine industrial uses and production. *In: Comprehensive Biotechnology*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 572–586. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09172-X>

BRENELLI, Livia *et al.* Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0985-8>

BREZOIU, Ana Maria *et al.* Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 133, n. August, p. 110787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110787>

BRONZATO, Giovana Roberta Francisco *et al.* Water hyacinth second-generation ethanol production: a mitigation alternative for an environmental problem. **Journal of Natural Fibers**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 1201–1208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15440478.2018.1458000>

BROWN, Adam *et al.* Advanced Biofuels – Potential for Cost Reduction, IEA Bioenergy: Task 41: 2020:01. **IEA Bioenergy**, [S. l.], p. 1–88, 2020. Disponível em: https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2020/02/T41_CostReductionBiofuels-11_02_19-final.pdf

BRUNNHOFER, Magdalena *et al.* The biorefinery transition in the European pulp and paper industry – A three-phase Delphi study including a SWOT-AHP analysis. **Forest Policy and Economics**, [S. l.], v. 110, p. 101882, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.02.006>

CALDEIRA, Carla *et al.* Sustainability of food waste biorefinery: A review on valorisation pathways, techno-economic constraints, and environmental assessment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 312, n. March, p. 123575, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123575>

CARTER, Randy L.; MORRIS, Robin; BLASHFIELD, Roger K. On the partitioning of squared Euclidean distance and its applications in cluster analysis. **Psychometrika**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 9–23, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02294446>

CARVALHO, Danilo José *et al.* Assessment of the self-sustained energy generation of an integrated first and second generation ethanol production from sugarcane through the characterization of the hydrolysis process residues. **Energy**

Conversion and Management, [S. l.], v. 203, n. November, p. 112267, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112267>

CATTANEO, Andrea *et al.* Reducing food loss and waste: Five challenges for policy and research. **Food Policy**, [S. l.], v. 98, p. 101974, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODPOL.2020.101974>

CHANDEL, Anuj K. *et al.* Lignocellulose biorefinery: Technical challenges, perspectives on industrialization, and solutions. *In*: **Production of Top 12 Biochemicals Selected by USDOE from Renewable Resources**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 1–39. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823531-7.00003-2>

CHANDEL, Anuj K.; SUKUMARAN, Rajeev K. Sustainable biofuels development in India. **Sustainable Biofuels Development in India**, [S. l.], p. 1–557, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50219-9>

CHANDRAKANT KHAIRE, Kaustubh; SURYAKANT MOHOLKAR, Vijayanand; GOYAL, Arun. Alkaline pretreatment and response surface methodology based recombinant enzymatic saccharification and fermentation of sugarcane tops. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 341, n. August, p. 125837, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125837>

CHAUBEY, Ankita; AADIL, Keshaw R.; JHA, Harit. Synthesis and characterization of lignin-poly lactic acid film as active food packaging material. **Materials Technology**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 585–593, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10667857.2020.1782060>

CHEN, Zhimin *et al.* Rice husk-based hierarchical porous carbon for high performance supercapacitors: The structure-performance relationship. **Carbon**, [S. l.], v. 161, p. 432–444, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.01.088>

CHI, Wenrui *et al.* Developing a highly pH-sensitive κ-carrageenan-based intelligent film incorporating grape skin powder via a cleaner process. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 244, n. xxxx, p. 118862, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118862>

CIULU, Marco; DE LA LUZ CÁDIZ-GURREA, Maria; SEGURA-CARRETERO, Antonio. Extraction and analysis of phenolic compounds in rice: A review. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 1–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23112890>

CLAES, Arne *et al.* Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. **Metabolic Engineering**, [S. l.], v. 59, n. December 2019, p. 131–141, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.02.004>

CLAXTON, Larry D. The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions: Part 5. Summary, comparisons, and conclusions. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 763, p. 103–147, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.10.001>

COOPER, Jeraz *et al.* Treatment and resource recovery options for first and second generation bioethanol spentwash – A review. **Chemosphere**, [S. l.], v. 241, p. 124975, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124975>

CORRADO, Sara; SALA, Serenella. Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook. **Waste Management**, [S. l.], v. 79, p. 120–131, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.032>

DA ROSA, Rafael Gabriel *et al.* Sustainable bioprocess combining subcritical water pretreatment followed by anaerobic digestion for the valorization of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) agro-industrial by-product in bioenergy and biofertilizer. **Fuel**, [S. l.], v. 334, p. 126698, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126698>

DA SILVA, Caroline M. S. *et al.* Pyrolysis of grape bagasse to produce char for Cu(II) adsorption: a circular economy perspective. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], v. 1, p. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02792-8>. Acesso em: 13 mar. 2023.

DAHUNSI, S. O. *et al.* Co-digestion of Theobroma cacao (Cocoa) pod husk and poultry manure for energy generation: Effects of pretreatment methods. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 283, n. March, p. 229–241, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.093>

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; OWEN, R. Fennema. **Química de Alimentos de Fennema**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. *E-book*.

DE ANDRADE JUNIOR, Milton Aurelio Uba *et al.* Exploring future scenarios of ethanol demand in Brazil and their land-use implications. **Energy Policy**, [S. l.], v. 134, n. September, p. 110958, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2019.110958>

DE ANDRADE NEVES, Nathália *et al.* Identification and quantification of phenolic composition from different species of Jabuticaba (*Plinia* spp.) by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, [S. l.], p. 129605, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129605>

DEBIAGI, Flávia; FARIA-TISCHER, Paula C. S.; MALI, Suzana. Nanofibrillated cellulose obtained from soybean hull using simple and eco-friendly processes based on reactive extrusion. **Cellulose**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 1975–1988, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02893-0>

DEL RÍO, Pablo G. *et al.* Third generation bioethanol from invasive macroalgae *Sargassum muticum* using autohydrolysis pretreatment as first step of a biorefinery. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 141, p. 728–735, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.083>

DENG, Huaxiang *et al.* Expression and characterisation of feruloyl esterases from *Lactobacillus fermentum* JN248 and release of ferulic acid from wheat bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 138, p. 272–277, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.086>

DENG, Zhichao *et al.* Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 159, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1499-3>. Acesso em: 2 jun. 2023.

DIAS, Matheus Cordazzo *et al.* Eco-friendly laccase and cellulase enzymes pretreatment for optimized production of high content lignin-cellulose nanofibrils. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 209, p. 413–425, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.005>. Acesso em: 13 jun. 2023.

DICKSON, Rofice; RYU, Jun Hyung; LIU, J. Jay. Optimal plant design for integrated biorefinery producing bioethanol and protein from *Saccharina japonica*: A superstructure-based approach. **Energy**, [S. l.], v. 164, p. 1257–1270, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.09.007>

DIN, Nur Akmal Solehah *et al.* Bioconversion of coconut husk fibre through biorefinery process of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 815–826, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S13399-020-00895-8>

DOMINGOS, Joana M. B. *et al.* Simultaneous recovery of ferulic acid and sugars from wheat bran enzymatic hydrolysate by dnanofiltration. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 242, n. December 2019, p. 116755, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116755>

DOS SANTOS, Leandro Vieira *et al.* Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0017>

DOW. **CARBOWAX™ Polyethylene Glycol (PEG) 1000**. [s. l.], 2021.

DU, Hongjian; PANG, Sze Dai. High performance cement composites with colloidal nano-silica. **Construction and Building Materials**, [S. l.], v. 224, p. 317–325, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.07.045>

DU, Jing *et al.* Nutritional Changes and Early Warning of Moldy Rice under Different Relative Humidity and Storage Temperature. **Foods 2022, Vol. 11, Page 185**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 185, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/FOODS11020185>. Acesso em: 13 mar. 2023.

DZIADAS, Mariusz; JELEŃ, Henryk H. Comparison of enzymatic and acid hydrolysis of bound flavor compounds in model system and grapes. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 190, n. July, p. 412–418, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.089>

EELAGER, Manjunath P. *et al.* Evaluation of mechanical, antimicrobial, and antioxidant properties of vanillic acid induced chitosan/poly (vinyl alcohol) active films to prolong the shelf life of green chilli. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 232, p. 123499, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123499>. Acesso em: 16 mar. 2023.

EPURE, Alexandra *et al.* Chemical analysis and antioxidant activity of some rooibos tea products. **Farmacia**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 963–966, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.6.5>

FANG, Junnan *et al.* Bioconversion of agricultural waste into poly-γ-glutamic acid in solid-state bioreactors at different scales. **Waste Management**, [S. l.], v. 102, p. 939–948, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.12.016>

FANG, Luwei *et al.* Dual ionic liquid-immobilized silicas for multi-phase extraction of aristolochic acid from plants and herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1592, p. 31–37, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.008>

FAO. **Food loss and waste | Climate Change | Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FERNANDES, Fabiano A. N. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolics from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: kinetics and mathematical modeling. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 2321–2328, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04270-3>

FERNANDES, Iara Janaína *et al.* Characterization of silica produced from rice husk ash: Comparison of purification and processing methods. **Materials Research**, [S. l.], v. 20, p. 519–525, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2016-1043>

FERRI, Maura *et al.* Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 56, p. 38–45, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.010>

FONSECA, G. C.; COSTA, C. B. B.; CRUZ, A. J. G. Economic analysis of a second-generation ethanol and electricity biorefinery using superstructural optimization. **Energy**, [S. l.], v. 204, p. 117988, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117988>

GALANOPOULOS, Christos *et al.* **An optimization model for a biorefinery system based on process design and logistics**. [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2019. v. 46E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818634-3.50045-X>

GARLAPATI, Vijay Kumar *et al.* Circular economy aspects of lignin: Towards a lignocellulose biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 130, n. June, p. 109977, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109977>

GERALDO, José *et al.* Estudo Preliminar do Custo de Produção in house de Celulases na Biorrefinaria de Etanol de Segunda Geração. [S. l.], n. November, 2020.

GHENDOV-MOSANU, Aliona *et al.* Chemometric Optimization of Biologically Active Compounds Extraction from Grape Marc: Composition and Antimicrobial Activity. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1–18, 2022 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27051610>

GHENDOV-MOSANU, Aliona *et al.* Chemometric Optimization of Biologically

Active Compounds Extraction from Grape Marc: Composition and Antimicrobial Activity. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1610, 2022 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27051610>. Acesso em: 10 mar. 2023.

GOMEZ, R. J. H. C.; PARK, Yong Kun. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana e sua fermentação por Pschysolen Tannophylus**. Campinas: [s. n.], 1985.

GUZEL KAYA, Gulcihan; YILMAZ, Elif; DEVECI, Huseyin. Synthesis of sustainable silica xerogels/aerogels using inexpensive steel slag and bean pod ash: A comparison study. **Advanced Powder Technology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 926–936, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.appt.2019.12.013>

GUZMAN-PUYOL, Susana *et al.* Transparent, UV-blocking, and high barrier cellulose-based bioplastics with naringin as active food packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 209, p. 1985–1994, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.04.177>

HAN, S. *et al.* High emission cross-section YVO₄:Nd nanocrystalline glass prepared by high-silica porous glass. **Materials Letters**, [S. l.], v. 253, p. 388–391, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.06.103>

HASSAN, Shady S.; WILLIAMS, Gwilym A.; JAISWAL, Amit K. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 101, n. June 2018, p. 590–599, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.041>

HERMOSILLA, Edward D.; SCHALCHLI, Heidi; DIEZ, María Cristina. Biodegradation inducers to enhance wheat straw pretreatment by *Gloeophyllum trabeum* to second-generation ethanol production. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], n. January, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07460-5>

HOU, Yun Hua *et al.* Expression of an alkaline feruloyl esterases from thermophilic *Chaetomium thermophilum* and its boosting effect on delignification of pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 150, n. June, p. 109859, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109859>

HUANG, Zhe *et al.* Using waste CO₂ to increase ethanol production from corn ethanol biorefineries: Techno-economic analysis. **Applied Energy**, [S. l.], v. 280, n.

September, p. 115964, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115964>

IBARRA, Liz Nathalia *et al.* Enzymatic activity of a recombinant β -1,4-endoglucanase from the Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) aiming second generation ethanol production. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56070-1>

IDRIS *et al.* Screening of potential lignin-degrading fungi from the tropical forest for lignocellulose biotreatment. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S. l.], v. 308, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012014>

ILAVENIL, Soundharrajan *et al.* Potential application of p-coumaric acid on differentiation of C2C12 skeletal muscle and 3T3-L1 preadipocytes-an in vitro and in silico approach. **Molecules**, [S. l.], v. 21, n. 8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21080997>

INDRIANI, D. W. *et al.* Silica Extraction From Rice Husk As a Slow Release Fertilizer Using Microwave Assisted Extraction. **Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences**, [S. l.], v. 96, n. 12, p. 195–200, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18551/rjoas.2019-12.24>

JATSCH, Anne Sophie; RUTHER, Joachim. Acetone application for administration of bioactive substances has no negative effects on longevity, fitness, and sexual communication in a parasitic wasp. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 1 January, p. e0245698, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245698>

JEELANI, Peerzada Gh *et al.* Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. **Silicon**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1337–1354, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12633-019-00229-y>

JIMÉNEZ-ISLAS, Donaji *et al.* A bibliometric analysis of sugar beet for production of biofuels. **International Journal of Energy Economics and Policy**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 57–63, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.32479/ijeep.11013>

JIN, Qing *et al.* **Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.014>

JIN, Xiaoli; WEI, Suzhen. Efficient short time pretreatment on lignocellulosic waste using an isolated fungus *Trametes* sp. W-4 for the enhancement of biogas

production. [S. I.], 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14573>. Acesso em: 29 maio. 2023.

JOHN, Thomas; SALIHU, Aliyu; ONYIKE, Elewechi. Assessment of cassava peels as renewable substrate for production of poly-γ-glutamic acid by *Bacillus subtilis*. **Environmental Sustainability**, [S. I.], v. 3, n. 2, p. 179–186, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00102-4>

KAUR, Jaskiran *et al.* Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: Nutraceutical and therapeutic potential. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], v. 122, p. 187–200, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.02.023>

KHALEGHIAN, Hoori; MOLAVERDI, Maryam; KARIMI, Keikhosro. Silica Removal from Rice Straw to Improve its Hydrolysis and Ethanol Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [S. I.], v. 56, n. 35, p. 9793–9798, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b02830>

KHALIL, Anees Ahmed *et al.* **Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives**. [S. I.]: Royal Society of Chemistry, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7ra04803c>

KHAN, Kaffayatullah *et al.* Effective use of micro-silica extracted from rice husk ash for the production of high-performance and sustainable cement mortar. **Construction and Building Materials**, [S. I.], v. 258, p. 119589, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119589>

KHAN, Muhammad Usman; AHRING, Birgitte Kiaer. Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications -A review. **Biomass and Bioenergy**, [S. I.], v. 128, n. January, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105325>

KNOTHE, Gerhard; RAZON, Luis F. Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, [S. I.], v. 58, p. 36–59, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.08.001>

KORKIE, L. J.; JANSE, B. J. H.; VILJOEN-BLOOM, M. Utilising Grape Pomace for Ethanol Production. **South African Journal of Enology & Viticulture**, [S. I.], v. 23, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21548/23-1-2152>. Acesso em: 10 mar. 2023.

KOTAIAH NAIK, D. *et al.* Pyrolysis of sorghum bagasse biomass into bio-char

and bio-oil products: A thorough physicochemical characterization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 127, n. 2, p. 1277–1289, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-016-6061-y>

KUMAR, Bikash; VERMA, Pradeep. Application of Hydrolytic Enzymes in Biorefinery and Its Future Prospects. In: SRIVASTAVA, Neha *et al.* (org.). **Microbial Strategies for Techno-economic Biofuel Production**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 59–83. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-7190-9_3

KUMAR, Naresh; PRUTHI, Vikas. **Potential applications of ferulic acid from natural sources**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>

KUNH, Sheila Simone *et al.* Valorization of poultry slaughterhouse sludge oil: a strategy to reduce Brazil's dependency on soybean oil in the biodiesel industry. **Environmental Technology (United Kingdom)**, [S. l.], v. 43, n. 14, p. 2177–2189, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1869318>

KUREK, Mia *et al.* Characterization of food packaging films with blackcurrant fruit waste as a source of antioxidant and color sensing intelligent material. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26092569>

KURNIAWATI, Selvia; NICELL, James A. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 99, n. 16, p. 7825–7834, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.084>

LADAKIS, Dimitrios *et al.* Biorefinery development, techno-economic evaluation and environmental impact analysis for the conversion of the organic fraction of municipal solid waste into succinic acid and value-added fractions. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 354, p. 127172, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127172>

LALUCE, Cecilia *et al.* Biomass and Bioenergy Effects of pretreatment applied to sugarcane bagasse on composition and morphology of cellulosic fractions. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 126, n. May, p. 231–238, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.03.002>

LANDA-RUIZ, Laura *et al.* Effect of the Addition of Sugar Cane Bagasse Ash on the Compaction Properties of a Granular Material Type Hydraulic Base. **European**

Journal of Engineering and Technology Research, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 76–79, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.24018/ejers.2021.6.1.2335>. Acesso em: 13 mar. 2023.

LANDAU, S.; CHISTER, I. Cluster Analysis: Overview. *In: International Encyclopedia of Education*. [S. l.]: Elsevier, 2010. p. 72–83. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-044894-7.01315-4>

LANGE, Lene; MEYER, Anne S. Potentials and possible safety issues of using biorefinery products in food value chains. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 84, n. September 2018, p. 7–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.016>

LARSEN, Jan *et al.* **Métodos de procesamiento de la biomasa lignocelulósica mediante autohidrólisis en una sola etapa e hidrólisis enzimática con derivación c5 e hidrólisis posterior**. Concessão: 2018.

LAU, Tiffany; HARBOURNE, Niamh; ORUÑA-CONCHA, Maria J. Optimization of enzyme-assisted extraction of ferulic acid from sweet corn cob by response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 1479–1485, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10155>

LE, Bao *et al.* Rice bran fermentation by lactic acid bacteria to enhance antioxidant activities and increase the ferulic acid, p-coumaric acid, and γ -oryzanol content. **Journal of Applied Biological Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 257–264, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3839/jabc.2019.035>

LEE, Kyoung-Mi *et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 123, p. 636–645, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.066>

LEMÕES, Juliana Silva *et al.* Chemical pretreatment of *Arundo donax* L. for second-generation ethanol production. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 31, p. 67–74, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.10.011>

LI, Jinyang *et al.* Biotechnology for Biofuels Metabolic engineering of the cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* to produce ethanol from cellobiose. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], p. 1–15, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1661-y>

LI, Mingfu *et al.* Enhancing isolation of p-coumaric and ferulic acids from

sugarcane bagasse by sequential hydrolysis. **Chemical Papers**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 499–507, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00890-y>

LI, Wu *et al.* Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of different extraction and hydrolysis procedures. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 147, p. 112250, 2020 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112250>

LIBREA, J. T. *et al.* Effect of Water and Acid Pre-treatment on the Physicochemical Properties of Rice Husk for Silica Extraction. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 540, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/540/1/012007>

LIMA, Isabel; BIGNER, Renee; WRIGHT, Maureen. Conversion of Sweet Sorghum Bagasse into Value-Added Biochar. **Sugar Tech**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 553–561, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0508-8>

LOU, Rui; ZHANG, Xiao. Evaluation of pretreatment effect on lignin extraction from wheat straw by deep eutectic solvent. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 344, n. PB, p. 126174, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126174>

MA, Gaoqi *et al.* Glycopolymer grafted silica gel as chromatographic packing materials. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20010010>

MACHADO, Natália B. *et al.* Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 128, n. May, p. 9–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.001>

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 11–17, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11743-002-0199-8>

MANDELLI, F. *et al.* Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 52, p. 770–775, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.005>

MANZANO-AGUGLIARO, F. *et al.* Scientific production of renewable energies worldwide : An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 18,

p. 134–143, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.020>

MAROLDI, Wédisley Volpato *et al.* Biosorption of phenolic compounds from *Plinia cauliflora* seeds in residual yeast: Kinetic, equilibrium, and bioaccessibility studies. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. e17156, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.17156>. Acesso em: 10 mar. 2023.

MARQUES, C. *et al.* Sorbitol Production From Biomass and Its Global Market. *In: Platform Chemical Biorefinery*. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 217–227. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802980-0.00012-2>

MARTILLANES, Sara *et al.* Cellulase-assisted extraction of phenolic compounds from rice bran (*Oryza sativa* L.): process optimization and characterization. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1719–1726, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00773-x>

MARTÍN-DIANA, Ana Belén *et al.* Wheat and oat brans as sources of polyphenol compounds for development of antioxidant nutraceutical ingredients. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10010115>

MARTÍN, Carlos *et al.* Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. **Holzforschung**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 483–487, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/HF.2007.106>

MASRAN, Ruqayyah *et al.* Simultaneous pretreatment and saccharification of oil palm empty fruit bunch using laccase-cellulase cocktail. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 29, p. 101824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101824>

MATEI, Jéssica C. *et al.* Comparative study of sugarcane bagasse and rice husks pretreatment with crude extract of ligninolytic enzymes and its effect in fermentable sugar yields. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

MATEI, Jéssica C. *et al.* Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in saccharification. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 157, p. 987–997, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.028>

MCDONALD, William F.; CARLSON, David Charles; D. BRADFORD, Wiley. **Biomass pretreatment**. Concessão: 2016.

MELENDEZ-RODRIGUEZ, Beatriz *et al.* Electrospun antimicrobial films of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing eugenol essential oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano9020227>

MENDES, F. M. *et al.* Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 119, n. September, p. 314–321, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.005>

MIRANDA, Bruna M. *et al.* A galactose-rich heteropolysaccharide extracted from “jaboticaba” (*Plinia cauliflora*) peels. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 249, n. July, p. 116821, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116821>

MIRMOHAMADSADEGHI, Safoora; KARIMI, Keikhosro. **Recovery of silica from rice straw and husk**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64321-6.00021-5>

MOHAMED, Elsayed T. *et al.* Adaptive laboratory evolution of *Pseudomonas putida* KT2440 improves p-coumaric and ferulic acid catabolism and tolerance. **Metabolic Engineering Communications**, [S. l.], v. 11, p. e00143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00143>

MOREIRA-VILAR, Flavia Carolina *et al.* The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110000>

MORENO, Antonio D. *et al.* Valorization of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10040814>

MUNHOZ, José Renato; MORABITO, Reinaldo. Optimization approaches to support decision making in the production planning of a citrus company: A Brazilian case study. **Computers and Electronics in Agriculture**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.05.016>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Isobutanol**. [s. l.], 2021.

NAYAK, A.; BHUSHAN, Brij. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], 2021.

I., v. 233, n. July 2018, p. 352–370, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.041>

NAZAR, Mudasir *et al.* Biological delignification of rice straw using laccase from *Bacillus ligniniphilus* L1 for bioethanol production: A clean approach for agro-biomass utilization. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 360, p. 132171, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132171>. Acesso em: 2 jun. 2023.

NOGUEIRA, Karoline Maria Vieira *et al.* Sugar transporters from industrial fungi: Key to improving second-generation ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 131, n. June, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109991>

NOVIA, Novia *et al.* Effect of Dilute Acid - Alkaline Pretreatment on Rice Husk Composition and Hydrodynamic Modeling with CFD. **Science and Technology Indonesia**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26554/sti.2019.4.1.18-23>

OGUNLEYE, Adetoro *et al.* **Poly-γ-glutamic acid: Production, properties and applications**. [S. l.]: Society for General Microbiology, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.081448-0>

OLIVEIRA, Girlaine Pereira; SILVA, Simone Rodrigues da; FILHO, João Alexio Scarpere. Maturation curve of jaboticaba ‘Sabará’. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4212>

ORIEZ, Vincent; PEYDECASTAING, Jérôme; PONTALIER, Pierre-Yves. Lignocellulosic Biomass Mild Alkaline Fractionation and Resulting Extract Purification Processes: Conditions, Yields, and Purities. **Clean Technologies**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 91–115, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cleantechnol2010007>

PANDEY, Ashok *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)

PANDIYAN, K. *et al.* Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 132, p. 723–741, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.049>

PAONE, Emilia; TABANELLI, Tommaso; MAURIELLO, Francesco. The rise of

lignin biorefinery. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [S. l.], v. 24, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.11.004>

PAULRAJ GUNDUPALLI, Martin *et al.* Effect of dewaxing on saccharification and ethanol production from different lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 339, n. June, p. 125596, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125596>

PHAN, Anh Dao Thi *et al.* Phytochemical characteristics and antimicrobial activity of Australian grown garlic (*Allium sativum* L.) cultivars. **Foods**, [S. l.], v. 8, n. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods8090358>

PILLET, Laurianne; DUFRESNE, Remy; CRELIER, Simon. Copper-induced Production of Laccases for Lignin Depolymerisation and Micropollutant Degradation by Laccase-mediator Systems. **CHIMIA**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 1058, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.1058>. Acesso em: 29 maio. 2023.

PODE, Ramchandra. Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 53, p. 1468–1485, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.051>

POLKO, Joanna K.; KIEBER, Joseph J. The regulation of cellulose biosynthesis in plants. **Plant Cell**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 282–296, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00760>

PRASETYO, Wegik Dwi *et al.* Insight into the sustainable integration of bio- and petroleum refineries for the production of fuels and chemicals. **Polymers**, [S. l.], v. 12, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/POLYM12051091>

PUNIA, Himani *et al.* Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] grains. **Cereal Research Communications**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 343–353, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00118-w>

QU, Chen *et al.* Directly Microwave-Accelerated Cleavage of C–C and C–O Bonds of Lignin by Copper Oxide and H₂O₂. **ChemSusChem**, [S. l.], v. 13, n. 17, p. 4510–4518, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.202000502>

RADAELLI, Juliana Cristina *et al.* Adaptability and stability of jabuticaba tree genotypes based on plant growth. **Acta Scientiarum - Agronomy**, [S. l.], v. 42, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.42573>

RALPH, John; LAPIERRE, Catherine; BOERJAN, Wout. Lignin structure and its

engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 56, p. 240–249, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>

RATTANAWONGWIBOON, Thitirat *et al.* Green acidic catalyst from cellulose extracted from sugarcane bagasse through pretreatment by electron beam irradiation and subsequent sulfonation for sugar production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 134–142, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.55713/jmmm.v32i4.1540>. Acesso em: 27 jul. 2023.

RAUF, Abdur *et al.* Comprehensive review on naringenin and naringin polyphenols as a potent anticancer agent. **Environmental Science and Pollution Research 2022 29:21**, [S. l.], v. 29, n. 21, p. 31025–31041, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11356-022-18754-6>. Acesso em: 16 mar. 2023.

REINA, Luis *et al.* Production of second generation ethanol using Eucalyptus dunnii bark residues and ionic liquid pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 93, p. 116–121, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.023>

REN, Jinping; TAO, Furong; CUI, Yuezhi. I-Glutamic Acid Crosslinked Cellulose Ester Films for Heavy Metal Ions Adsorption. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1302–1314, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01690-2>

RESENDE, Laís M.; OLIVEIRA, Leandro S.; FRANCA, Adriana S. Characterization of jabuticaba (*Plinia cauliflora*) peel flours and prediction of compounds by FTIR analysis. **Lwt**, [S. l.], v. 133, n. August, p. 110135, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110135>

RIBEIRO SANCHES, Marcio Augusto *et al.* Development, characterization and optimization of biopolymers films based on starch and flour from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 343, n. May 2020, p. 128430, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128430>

RIYAP, Hamed I. *et al.* Microstructure and mechanical, physical and structural properties of sustainable lightweight metakaolin-based geopolymers cements and mortars employing rice husk. **Journal of Asian Ceramic Societies**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 199–212, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21870764.2019.1606140>

RODRIGUES, C. *et al.* Production and Application of Lactic Acid. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 543–556. *E-book*.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00024-5>

RODRIGUEZ, Alberto *et al.* Evaluation of bacterial hosts for conversion of lignin-derived p-coumaric acid to 4-vinylphenol. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01670-8>

ROSA, Marcelo Pereira da. **Extração de Lignina do resíduo de casca de arroz pelo Extração de Lignina do resíduo de casca de arroz pelo Método Organossolve**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.

SAINI, Anita; AGGARWAL, Neeraj K.; YADAV, Anita. Microbial cellulases: Role in second-generation ethanol production. **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**, [S. l.], p. 167–187, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_8

SAJID, Zaman; DA SILVA, Maria Aparecida Batista; DANIAL, Syed Nasir. Historical analysis of the role of governance systems in the sustainable development of biofuels in Brazil and the United States of America (USA). **Sustainability (Switzerland)**, [S. l.], v. 13, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su13126881>

SANDES, L. V. O. *et al.* Pyrolysis of Lignocellulosic Waste from Second-Generation Ethanol Industry. **Sugar Tech**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00941-9>

SANTOS, Adirana M. dos. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA: Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Rio Largo: [s. n.], 2018.

SANTOS, Fernando *et al.* **Production of second-generation ethanol from sugarcane**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814236-3.00011-1>

SANTOS, Fernando a *et al.* Otimização Do Pré-Tratamento Hidrotérmico Da Palha De Cana-De-Açúcar. **Química Nova**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.

SAQIB, Abdul Aala Najmus; WHITNEY, Philip John. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>

SAXENA, R. K. *et al.* Production and Applications of Succinic Acid. *In*: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and**

Purification of Industrial Products. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 601–630. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00027-0>

SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn *et al.* Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing fungal enzymes to enhance second-generation ethanol yield. **Applied Energy**, [S. l.], v. 262, n. September 2019, p. 114493, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114493>

SCHROEDTER, Linda *et al.* Biorefinery Concept Employing *Bacillus coagulans* : LX-Lignin and L- (+) -Lactic Acid from Lignocellulose. [S. l.], 2021.

SEBASTIÁN-NICOLÁS, Jessica L. *et al.* Valorization of whey using a biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1010–1027, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>

SEKIFUJI, Ryoko; VAN CHIEU, Le; TATEDA, Masafumi. Investigation of negative effects of rice husk silica on komatsuna growth using three experiments. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, [S. l.], v. 8, n. 2006, p. 311–319, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40093-019-00303-w>

SHADIDI, Behdad; NAJAFI, Gholamhassan. Impact of covid-19 on biofuels global market and their utilization necessity during pandemic. **Energy Equipment and System**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 371–382, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.22059/EES.2021.248655>

SHARIFI-RAD, Javad *et al.* Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>

SHARMA, Abha *et al.* Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance. **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9>

SHARMA, Abha *et al.* A biorefinery approach for the production of ferulic acid from agroresidues through ferulic acid esterase of lactic acid bacteria. **3 Biotech**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1–10, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02360-9>

SHARMA, Ajay Kumar; *et al.* **An improved process for second generation ethanol production.** Concessão: 2020b.

SHEN, Yafei; ZHANG, Niyu. Facile synthesis of porous carbons from silica-rich

rice husk char for volatile organic compounds (VOCs) sorption. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 282, n. February, p. 294–300, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.025>

SHERPA, Knawang Chhunji *et al.* An integrated biorefinery approach for bioethanol production from sugarcane tops. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 352, n. August 2021, p. 131451, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131451>

SHIMIZU, Felipe Lange *et al.* Minimum Lignin and Xylan Removal to Improve Cellulose Accessibility. **BioEnergy Research**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 775–785, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10120-z>

SHIN, Sang Kyu *et al.* Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 289, n. June, p. 121728, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121728>

SHLEEV, Sergey *et al.* Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. **Biochimie**, [S. l.], v. 88, n. 9, p. 1275–1285, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.007>

SIGMA ALDRICH. **Product Results**. [s. l.], 2021.

SIGMA ALDRICH. **Tabela e lista de espectro IV**. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>. Acesso em: 14 jan. 2023.

SILVA, Jailson Marques da *et al.* Study of the Fermentation Process of Different Fruit Biomasses. **Revista Eletrônica TECCEN**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 58–64, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21727/teccen.v11i2.1331>

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. **American journal of enology and viniculture**, [S. l.], 1965.

SOUZA, Priscila Katherine De *et al.* Evaluation of Second-Generation Ethanol Production from Mixtures of Banana Pseudostem, Peel and Rejected Fruit Using Aspen Hysys Simulation. **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 268–278, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0040>

STAFUSSA, Ana Paula *et al.* Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by waste yeast: kinetic and isotherm studies. **Journal of Food Engineering**,

[S. I.], v. 169, p. 53–60, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.016>

STHEL, Marcelo S. *et al.* Pollutant gas and particulate material emissions in ethanol production in Brazil: social and environmental impacts. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. I.], v. 26, n. 34, p. 35082–35093, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06613-w>

STRAZZERA, Giuseppe *et al.* Optimization of short chain volatile fatty acids production from household food waste for biorefinery applications. **Environmental Technology and Innovation**, [S. I.], v. 23, p. 101562, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101562>

SUN, Kai *et al.* Trametes versicolor laccase-assisted oxidative coupling of estrogens: Conversion kinetics, linking mechanisms, and practical applications in water purification. **Science of The Total Environment**, [S. I.], v. 782, p. 146917, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146917>

SUN, Yiqi *et al.* Grafting Lignin with Bioderived Polyacrylates for Low-Cost, Ductile, and Fully Biobased Poly(lactic acid) Composites. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. I.], v. 8, n. 5, p. 2267–2276, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06593>

SUPERBIA, Fabio Florêncio; PAULA, Nádia Figueiredo D. E. Utilização da palha de cana de açúcar para produção de papel artesanal. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal**, [S. I.], v. 3, p. 1–4, 2011.

ŠURIĆ, Jona *et al.* Positive impact of European Directives on the Implementation of Biofuels in Croatia. **Technologica Acta**, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 1–6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5520525>

TAGHIZADEH-ALISARAEI, Ahmad *et al.* Potential of biofuel production from pistachio waste in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. I.], v. 72, n. May 2016, p. 510–522, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.111>

TAKADA, Masatsugu; CHANDRA, Richard P.; SADDLER, John N. The influence of lignin migration and relocation during steam pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood and corn stover biomass substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. I.], v. 116, n. 11, p. 2864–2873, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.27137>

TANGKHAWANIT, Ekkarat; SIRIAMORNPUN, Sirithon. Bioactive compounds, biological activity, and starch digestibility of dried soy residues from the soybean oil industry and the effects of hot-air drying. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 1719–1728, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11514>

TANPICHAI, Supachok; WITAYAKRAN, Suteera; BOONMAHITTHISUD, Anyaporn. Study on structural and thermal properties of cellulose microfibers isolated from pineapple leaves using steam explosion. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102836>

TAO, Peng *et al.* Enzymatic pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from bagasse pulp: Transition of cellulose crystal structure. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 214, n. January, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.012>

TEDESCO, Doriana Eurosia Angela *et al.* Fruit and vegetable wholesale market waste: Safety and nutritional characterisation for their potential re-use in livestock nutrition. **Sustainability (Switzerland)**, [S. l.], v. 13, n. 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su13169478>

THELEN, Darryl G.; MARTIN, Jack A.; ROTH, Joshua D. **Patent Application Publication: US 2019 / 0125831 A1**. Concessão: 2019.

TIŠMA, Marina *et al.* Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. **Journal of the Institute of Brewing**, [S. l.], v. 124, n. 2, p. 182–186, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.479>. Acesso em: 13 jun. 2023.

TORRES-GARCIA, Enelio; BRACHI, Paola. Non-isothermal pyrolysis of grape marc: Thermal behavior, kinetics and evolved gas analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 1463–1478, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08530-z>

TSAGKARI, Mirela; KOKOSSIS, Antonis; DUBOIS, Jean Luc. A method for quick capital cost estimation of biorefineries beyond the state of the art. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1061–1088, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.2114>

TSIPIRAS, Dionysis *et al.* Biofuels Production from Orange Juice Industrial

Waste within a Circular Economy Vision. **SSRN Electronic Journal**, [S. l.], v. 49, n. July, p. 103028, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4115322>

UBANDO, Aristotle T.; FELIX, Charles B.; CHEN, Wei Hsin. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 299, n. November 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122585>

UCHÔA, Patrícia Zigoski *et al.* Ethanol from residual biomass of banana harvest and commercialization: A three-waste simultaneous fermentation approach and a logistic-economic assessment of the process scaling-up towards a sustainable biorefinery in Brazil. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 174, n. May, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114170>

UPADHYAY, Priya *et al.* Biotransformation of corn bran derived ferulic acid to vanillic acid using engineered *Pseudomonas putida* KT2440. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 341–348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697935>

VALDERRAMA, Leonardo *et al.* Proposal of a Didactic Experiment To Teach Principal Component Analysis. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 245–249, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150166>

VAN ERVEN, Gijs *et al.* Structural Motifs of Wheat Straw Lignin Differ in Susceptibility to Degradation by the White-Rot Fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 24, p. 20032–20042, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05780>

VAN ROSSUM, Guus *et al.* Liquefaction of lignocellulosic biomass: Solvent, process parameter, and recycle oil screening. **ChemSusChem**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 253–259, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.201300297>

VANHOLME, Ruben *et al.* Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 56, n. Table 1, p. 230–239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>

VAZ, Fernanda Leitão *et al.* Valorization of Sugar-Ethanol Industry Waste Vinasse for Increased Second-Generation Ethanol Production Using *Spathaspora passalidarum* Yeast Strains. **Sugar Tech**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 312–319, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0691-2>

VERDÚ, Samuel *et al.* Application of laser backscattering imaging for the

physico-chemical characterisation of antimicrobial silica particles functionalised with plant essential oils. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 280, n. December 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109990>

WANG, Wenjun *et al.* Ellagic Acid: A Dietary-Derived Phenolic Compound for Drug Discovery in Mild Cognitive Impairment. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.925855>. Acesso em: 16 mar. 2023.

WANG, Yue *et al.* Enhancing bio-butanol production from biomass of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with sequential alkali pretreatment and acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 200, p. 557–564, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.056>

WANYO, Pitchaporn; MEESO, Naret; SIRIAMORNPNUN, Sirithon. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 157, p. 457–463, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.061>

WEE, Nik Nur Atiqah Nik *et al.* Synthesis of silica from rice husk using acid pretreatment and its characterization. **AIP Conference Proceedings**, [S. l.], v. 2068, n. February, p. 6–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.5089367>

WOLD, Svante; ESBENSEN, Kim; GELADI, Paul. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. l.], v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

WOOD, Ian P. *et al.* Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0599-6>

XIAO, Yaqing *et al.* Cellulose nanocrystals prepared from wheat bran: Characterization and cytotoxicity assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 140, p. 225–233, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.160>

XU, Zhenshang; WANG, Ting; ZHANG, Susu. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 288, n. 72, p. 121526, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121526>

YANG, Chenlu *et al.* **Phenolic composition of grape pomace and its**

metabolism. [S. l.]: Taylor & Francis, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2146048>. Acesso em: 10 mar. 2023.

YANG, Haibing *et al.* Overcoming cellulose recalcitrance in woody biomass for the lignin-first biorefinery. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1503-y>

YANG, Haiyan *et al.* Effect of hydrothermal pretreated bamboo lignin on cellulose saccharification for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 156, n. June, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112865>

YANG, Weijun *et al.* Poly(lactic acid)/lignin films with enhanced toughness and anti-oxidation performance for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 144, p. 102–110, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.085>

YAO, B. *et al.* Fuels, power and chemical periodicity. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, [S. l.], v. 378, n. 2180, p. 20190308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0308>

YEO, Jun Yi *et al.* Comparative studies on the pyrolysis of cellulose, hemicellulose, and lignin based on combined kinetics. **Journal of the Energy Institute**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 27–37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joei.2017.12.003>

YU, Jianming *et al.* Process integration for ethanol production from corn and corn stover as mixed substrates. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 279, n. December 2018, p. 10–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.112>

ZANIVAN, Jessica *et al.* Evaluation of Bioethanol Production from a Mixed Fruit Waste by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 175–182, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10273-5>

ZHANG, Changwei *et al.* Simultaneous saccharification and juice co-fermentation for high-titer ethanol production using sweet sorghum stalk. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 134, p. 44–53, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.005>

ZHANG, Ren-Kuan *et al.* Lignin valorization for protocatechuic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 23, n. 17, p. 6515–6526, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d1gc01442k>

ZHANG, Shuping *et al.* Physicochemical structure and reactivity of char from torrefied rice husk: Effects of inorganic species and torrefaction temperature. **Fuel**, [S. l.], v. 262, n. November, p. 116667, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116667>

ZHANG, Y. H. Percival. **Method and apparatus for lignocellulose pretreatment using a super-celullulose-solvente and highly volatile solvents**. Concessão: 2014.

ZHAO, Chen Hui *et al.* Engineering budding yeast for the production of coumarins from lignin. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 160, n. May, p. 107634, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107634>

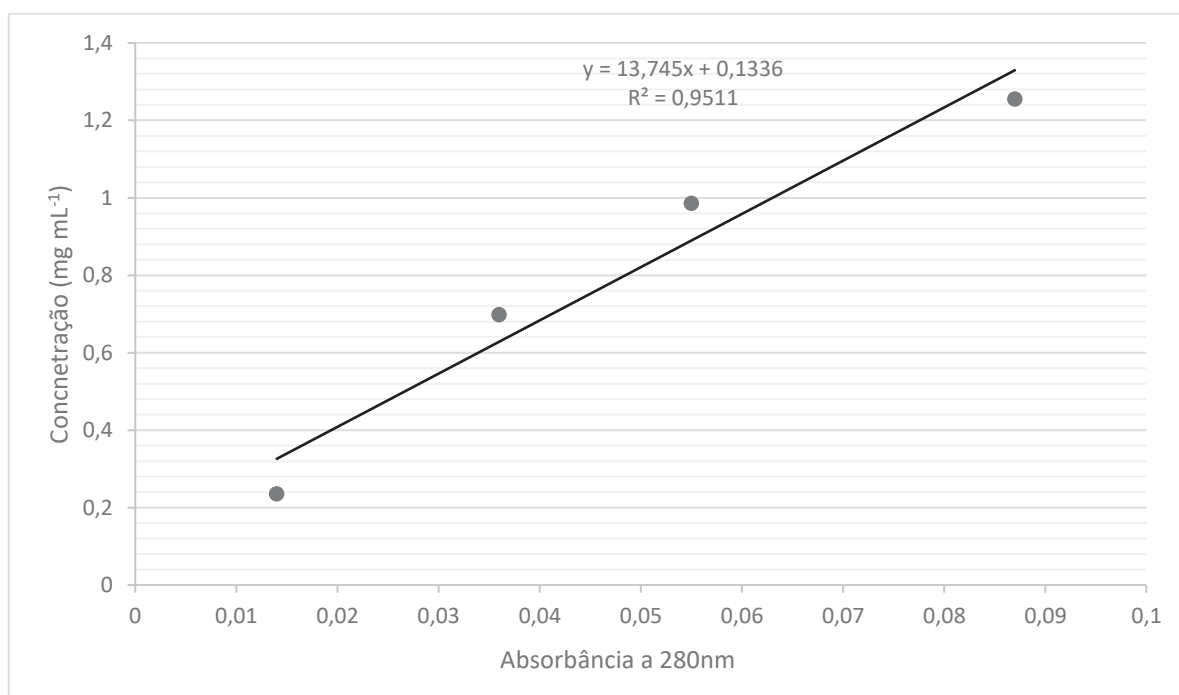
ZHENG, Rui *et al.* Antioxidant/antihyperglycemic activity of phenolics from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 101, p. 104–114, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.012>

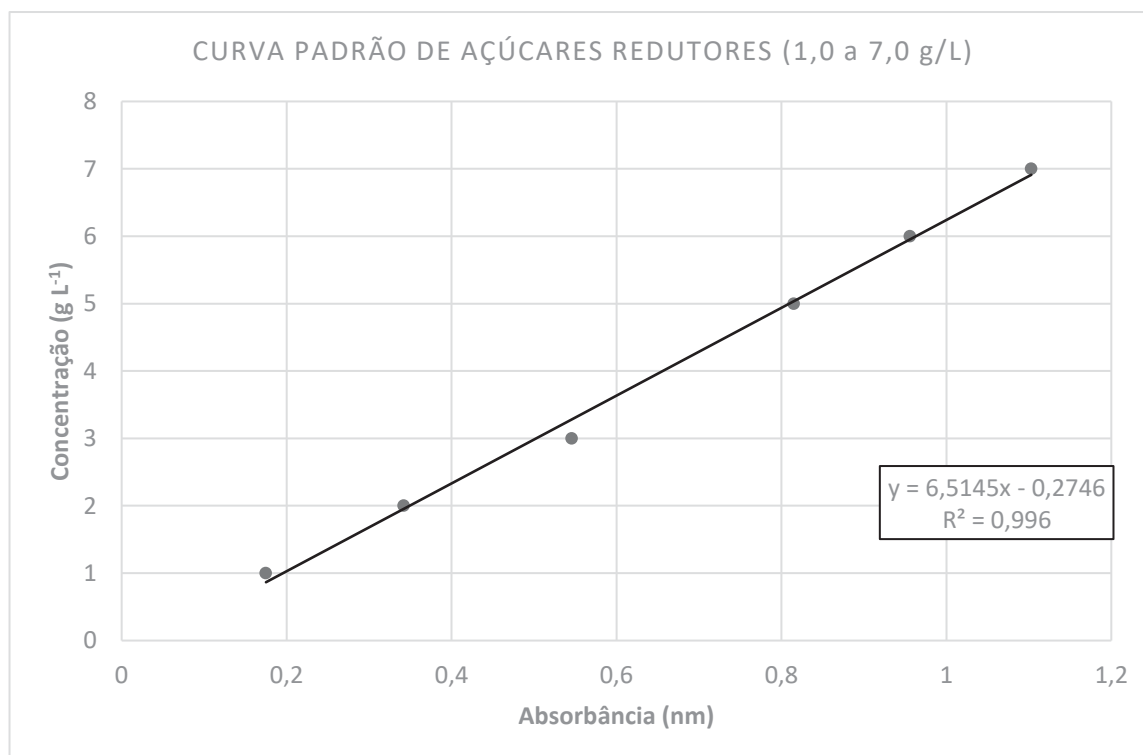
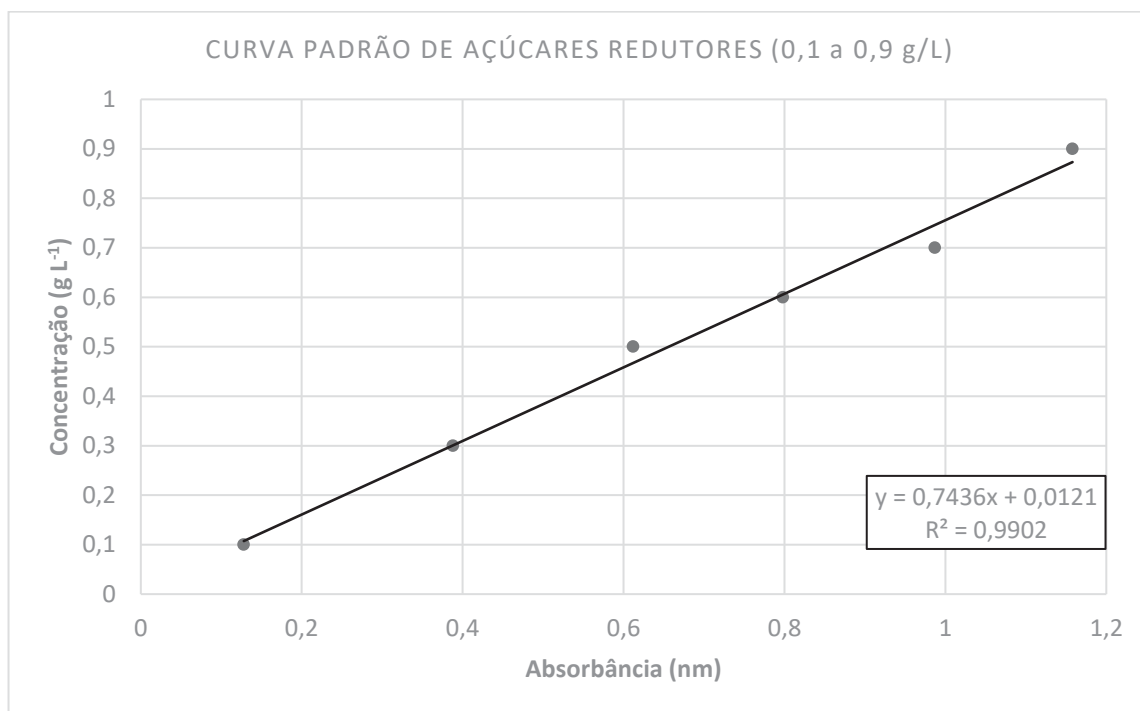
ZHONG, Lei *et al.* NaOH-Aided Sulfolane Pretreatment for Effective Fractionation and Utilization of Willow (*Salix matsudana* cv. Zhuliu) . **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S. l.], v. 59, n. 39, p. 17546–17553, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c01208>

ZHONG, Lei *et al.* Alkali-catalyzed organosolv pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic hydrolysis and results in highly antioxidative lignin. **Energy and Fuels**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 5039–5048, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c00320>

ZHU, Heyu *et al.* Ellagic Acid and Its Anti-Aging Effects on Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 10937**, [S. l.], v. 23, n. 18, p. 10937, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS231810937>. Acesso em: 16 mar. 2023.

ZOU, Yanping; YANG, Tiankui. **Rice husk, rice husk ash and their applications**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812828-2.00009-3>

APÊNDICE 1: Curva padrão de lignina (método de brometo de acetila)

APÊNDICE 2: Curva padrão de açúcares redutores

APÊNDICE 3: Curva padrão para a análise de compostos fenólicos totais