

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS  
RECURSOS RENOVÁVEIS

GABRIELA FIORI DA SILVA

**Avaliação do potencial do bagaço de laranja industrial peletizado para a  
produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* via fermentação acetona-butanol-  
etanol**

Sorocaba

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CAMPUS SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS  
RECURSOS RENOVÁVEIS

GABRIELA FIORI DA SILVA

**Avaliação do potencial do bagaço de laranja industrial peletizado para a  
produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* via fermentação acetona-butanol-  
etanol**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Planejamento e  
Uso dos Recursos Renováveis, para a  
obtenção do título de mestre.  
Orientação: Profa. Dra. Iolanda  
Cristina Silveira Duarte.  
Co-orientação: Profa. Dra. Maria  
Bernadete Amâncio Varesche Silva.

Sorocaba

2019

Fiori da Silva, Gabriela

Avaliação do potencial do bagaço de laranja industrial peletizado para a produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* via fermentação acetona-butanol-etanol / Gabriela Fiori da Silva. -- 2019.

72 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca examinadora: Fabrício Motteran, João Guilherme Pereira Vicente

Bibliografia

1. Pré-tratamento. 2. Biomassa. 3. Fermentação ABE. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

GABRIELA FIORI DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO BAGAÇO DE LARANJA  
INDUSTRIAL PELETIZADO PARA A PRODUÇÃO DE  
BUTANOL POR *Clostridium beijerinckii* VIA FERMENTAÇÃO  
ACETONA-BUTANOL-ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de mestre em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis,  
Universidade Federal de São Carlos,  
Sorocaba, 12 de março de 2019.

Orientador:



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Sorocaba

Examinadores:



\_\_\_\_\_  
Dr. Fabrício Motteran  
Universidade de São Paulo – USP São Carlos



\_\_\_\_\_  
Dr. João Guilherme Pereira Vicente  
Faculdade de Engenharia de Sorocaba - FACENS

*A Rafael de Souza, por todo apoio, por tudo e por tanto.  
Aos meus pais pelo apoio incondicional sempre, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte, por todo incentivo, dedicação, orientação e por esta oportunidade.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva pela co-orientação, tempo concedido e à toda sua equipe do Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), em especial à técnica Janja pela receptividade e paciência.

À técnica Mônica e a todos envolvidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFSCar-Sorocaba que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Samir e ao Prof. Dr. Aparecido Júnior pelo tempo cedido e auxílio nas análises de caracterização.

À Maria Eduarda Della Rosa pela dedicação e auxílio durante a fase de fermentação.

Ao Laboratório de Biomassa e Bioenergia da UFSCar-Sorocaba pelos equipamentos emprestados.

À Faculdade de Engenharia de Sorocaba FACENS, em especial ao Prof. Dr. João Guilherme pelas análises de caracterização.

À empresa Sucocítrico Cutrale LTDA por fornecer o bagaço de laranja peletizado para a realização deste estudo.

Ao Rafael de Souza pela generosidade e companheirismo, seu apoio é imprescindível.

À minha família pela torcida, em especial à Marina Fiori pela parceria e dedicação em tudo que fez.

## Resumo

Dentre as biomassas lignocelulósicas residuais produzidas em grande quantidade no Brasil destaca-se o resíduo gerado na produção industrial de suco de laranja. Esse resíduo pode ser considerado como fonte de matéria-prima em processos fermentativos e conseqüentemente ser utilizado na fabricação de diversos produtos de valor agregado. Solventes oriundos da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE) podem ser um exemplo de processo fermentativo onde bactérias anaeróbias utilizam fontes de carbono de resíduos agroindustriais. Dessa forma o presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de butanol via fermentação ABE utilizando *Clostridium beijerinckii* a partir de bagaço de laranja industrial peletizado. Esse bagaço foi moído, caracterizado quimicamente e quantificado quanto a sua composição em holocelulose (18,99 %),  $\alpha$ -celulose (5,37 %), hemicelulose (13,62 %), lignina (6,16 %), pectina (7,21 %) e proteína (3,14 %). Posteriormente foi submetido a pré-tratamentos de ultrassom, autohidrólise e hidrólise ácido-diluído seguidos de hidrólise enzimática, no entanto esses pré-tratamentos não realçaram significativamente a quantidade de açúcares redutores totais (ART) disponíveis em comparação com o bagaço tratado somente com hidrólise enzimática. No final da hidrólise enzimática, foi possível obter 4,301 g/L de açúcares na fase líquida (hidrolisado), o qual foi usado nos ensaios de fermentação. A fermentação ABE foi realizada em frascos-reatores em batelada a 37 °C sob agitação de 160 rpm em condições anaeróbias sendo o ensaio controle com glicose. Durante a fermentação foram retiradas amostras para análises de açúcares, solventes, ácidos orgânicos e biomassa celular. Após 120 horas de fermentação com hidrolisado de laranja o consumo de açúcares foi de 75 %, e com glicose de 78 %, a produção de butanol foi de 0,069 g/L (rendimento de 0,02 g/g) e 0,237 g/L (rendimento de 0,071 g/g), respectivamente. A produção de solventes e ácidos orgânicos, demonstrou que o bagaço de laranja peletizado possui potencial para fermentação ABE, pois mesmo sem pré-tratamento esta biomassa gerou produtos de interesse industrial.

**Palavras-chave:** Pré-tratamento, biomassa, fermentação ABE.

## Abstract

Among the lignocellulosic biomass produced in large quantities in Brazil, the production of orange juice stands out. This residue can be considered as source of raw material in fermentative processes and consequently leading to a generation of value-added products. Acetone-butanol-ethanol fermentation (ABE) may be a fermentation process of anaerobic bacteria sources of carbon from agro-industrial waste. Thus, the present study had to evaluate the butanol via ABE fermentation using *Clostridium beijerinckii* from pelletized industrial orange pomace. This bagasse was milled, chemically compounded and quantified as to its composition in holocellulose (18.99 %), alfacelulose (5.37 %), hemicellulose (13.62 %), lignin (6.16 %), pectin (7.21 %) and protein (3.14 %) and is subjected to a pretreatment of ultrasound, autohydrolysis and acid-diluted followed by enzymatic hydrolysis to verify an amount of fermentable total reducing sugars (ART). The ABE fermentation was carried out in batch-reactors at 37 °C under agitation of 160 rpm under anaerobic conditions. During a fermentation samples were taken for analyzes of sugars and solvents. Pretreatments followed by enzymatic hydrolysis do not enhance a significant amount of available ART compared to bagasse rather than enzymatic hydrolysis. At the end of the enzymatic hydrolysis, it was possible to obtain 4,301 g/L of sugars in the liquid phase (hydrolyzed) and can be fermented. At the end (120 h) of the orange hydrolysate fermentation the consumption of sugars was 75.42%, and at 78.10% for the control using glucose, butanol production was 0.069 g/L (yield 0.02 g/g) and 0.237 g/L (yield 0.071 g/g), respectively. Production of solvent has shown that orange pomace has potential for ABE fermentation.

**Keywords:** Pretreatment, biomass, ABE fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conversão bioquímica de biomassa lignocelulósica.....	4
Figura 2. Estrutura dos monolignóis precursores da lignina.....	6
Figura 3. Esquema estrutural da pectina.....	6
Figura 4. Alguns produtos de interesse industrial gerados a partir do metabolismo de espécies de <i>Clostridium</i> sp.....	12
Figura 5. Diferentes resíduos e seus substratos gerados e suas subunidades monoméricas primárias diversas que podem ser fermentadas por <i>Clostridium</i> sp.....	13
Figura 6. Via fermentativa acetona-butanol-etanol por <i>Clostridium</i> sp.....	14
Figura 7. Isômeros do butanol.....	15
Figura 8. Síntese química do butanol.....	17
Figura 9. Etapa I do desenvolvimento experimental.....	20
Figura 10. Etapa II do desenvolvimento experimental.....	26
Figura 11. Etapa III do desenvolvimento experimental.....	28
Figura 12. Micrografia por MEV do bagaço de laranja peletizado.....	32
Figura 13. Espectro de FTIR do bagaço de laranja peletizado antes e após branqueamento.....	33
Figura 14. Concentração de ART/g após hidrólise enzimática dos diferentes pré-tratamentos.....	35
Figura 15. Espectros de FTIR do bagaço de laranja peletizado após pré-tratamentos.....	39
Figura 16. Açúcares obtidos após hidrólise enzimática do bagaço de laranja peletizado.....	41
Figura 17. Consumo de açúcares por <i>Clostridium beijerinckii</i> ao longo da fermentação ABE do hidrolisado de laranja como substrato.....	41
Figura 18. Consumo de glicose por <i>Clostridium beijerinckii</i> ao longo da fermentação ABE controle.....	42
Figura 19. Fermentação ABE controle com glicose como fonte de carbono.....	43
Figura 20. Fermentação ABE controle do hidrolisado como fonte de carbono.....	44
Figura 21. Biomassa seca durante a fermentação ABE.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de biomassa lignocelulósica e suas composições de celulose, hemicelulose e lignina.....	5
Tabela 2. Subprodutos do processamento de cítricos.....	8
Tabela 3. Propriedades dos combustíveis butanol, etanol e gasolina.....	16
Tabela 4. Obtenção de butanol a partir da fermentação ABE com diversas biomassas lignocelulósicas.....	18
Tabela 5. Caracterização do bagaço de laranja peletizado.....	30
Tabela 6. Composição do bagaço de laranja peletizado.....	31
Tabela 7. Bandas características observadas em espectros de FTIR.....	34
Tabela 8. Interações entre as condições em foram submetidas o bagaço de laranja peletizado seguido de hidrólise enzimática.....	36
Tabela 9. Valores médios em gramas de ART por grama de bagaço das condições em que foi submetido o bagaço de laranja peletizado.....	36
Tabela 10. Valores de p uni-caudal para a interação entre os tratamentos.....	36
Tabela 11. Bandas características observadas em espectros de FTIR.....	40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Biomassa lignocelulósica e suas principais fontes.....	4
Quadro 2. Vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica.....	10

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABE – Acetona-butanol-etanol

ART – Açúcares redutores totais

ATCC – *American Type Culture Collection*

Abs – Absorbância

BSA – *Bovine Serum Albumin*

°C – Grau Celsius

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FTIR – *Fourier-transform infrared spectroscopy*

LAMA – Laboratório de Microbiologia Ambiental

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mt – Milhões de toneladas

NREL – *National Renewable Energy Laboratory*

rpm – Rotações por minuto

TGY – *Tryptone-yeast-extract-acetate*

TAPPI – *Technical Association of Pulp and Paper Industry*

v/v – Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	3
2.2 Laranja .....	7
2.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica .....	9
2.4 Hidrólise enzimática .....	10
2.5 <i>Clostridium</i> sp.....	11
2.6 Fermentação acetona-butanol-etanol .....	12
2.7 Butanol.....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivos específicos .....	19
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
4.1 Armazenamento e preparação da biomassa .....	200
4.2 Caracterização do bagaço de laranja peletizado .....	21
4.2.1 Determinação de sólidos totais e teor de umidade.....	21
4.2.2 Determinação do teor de cinzas .....	22
4.2.3 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel.....	22
4.2.4 Determinação do teor de lignina Klason solúvel .....	23
4.2.5 Determinação do teor de alfa-celulose .....	23
4.2.6 Determinação do teor de holocelulose.....	24
4.2.7 Determinação do teor de hemicelulose.....	24
4.2.8 Análise na espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	25
4.3 Determinação da pectina.....	25
4.4 Determinação do poder calorífico superior .....	25
4.5 Determinação do teor de proteína.....	26

4.6 Processos de pré-tratamentos .....	26
4.6.1 Autohidrólise .....	26
4.6.2 Ácido-diluído .....	26
4.6.3 Ultrassom .....	27
4.7 Hidrólise enzimática .....	27
4.8 Determinação de açúcares redutores totais .....	27
4.9 Preparo do inóculo .....	28
4.10 Fermentação acetona-butanol-etanol .....	28
4.11 Análise de produtos da fermentação .....	29
4.12 Análise estatística .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1 Caracterização da biomassa .....	30
5.2 Poder calorífico superior.....	34
5.3 Pré-tratamentos seguidos de hidrólise enzimática no bagaço de laranja peletizado .....	35
5.3 Fermentação acetona-butanol-etanol .....	40
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por novas fontes de biomassa para a produção de combustíveis e produtos de interesse biotecnológico é de extrema necessidade, uma vez que os combustíveis fósseis ainda são a principal fonte de energia do mundo e seus impactos causam sérios problemas ambientais (VOLPE et al., 2015). A utilização de biomassa proveniente de resíduo agroindustrial no processo fermentativo torna-se bastante favorável por serem considerados uma fonte potencial de energia e de alto valor agregado (JANG et al., 2012; ABDEHAGH; TEZEL; THIBAUT, 2014; FOO, 2016; MATHARU; DE MELO; HOUGHTON, 2016).

Dentre os diversos resíduos agroindustriais, o bagaço de laranja é uma matéria-prima promissora, com possibilidade a partir do seu uso via processo fermentativo a obtenção de produtos de alto valor agregado com baixo custo e produção viável (SANTOS et al., 2015).

No mundo, mais de 88 milhões de toneladas de frutas cítricas são produzidas todos os anos, sendo que mais de 50 % é destinada à produção de suco (MARÍN et al., 2007). O Brasil é considerado o maior produtor de laranja do mundo, disponibilizando uma área de 800.000 hectares. Também é o maior exportador de frutas cítricas processadas, sendo o suco de laranja congelado e concentrado seu principal produto. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (2015), estima-se que a produção brasileira de laranja para processamento deve aumentar em 2023/24 e as exportações de suco poderão chegar a 2,6 milhões de toneladas (FAO; AGRÍCOLAS, 2015; SANTOS et al., 2015).

Por haver uma grande quantidade deste resíduo disponível, sua utilização pode ser promissora na produção de biocombustíveis, mais precisamente butanol, a partir da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE). Esses produtos podem ser usados como solventes em diversos setores industriais e possuem grande potencial para substituir a energia petroquímica (combustíveis e solventes derivados do petróleo). Porém, devido à baixa eficiência dos microrganismos na conversão dos carboidratos e o alto custo da recuperação dos produtos da fermentação, ainda sua aplicação é desfavorável em larga escala (TASHIRO; TAKEDA; KOBAYASHI, 2004; KUMAR; GAYEN, 2011; ABD-ALLA; ELSADEK EL-ENANY, 2012).

O butanol é caracterizado pela fórmula molecular  $C_4H_9OH$ , onde seus quatro carbonos podem formar uma estrutura linear ou ramificada, atribuindo diferentes propriedades à molécula (RAKOPOULOS et al., 2011). Possui diversas aplicações na indústria, como para revestimento de superfícies de látex, esmaltes, lacas, como solvente na fabricação de óleo, em produtos farmacêuticos e perfumes, além de ser um combustível (QURESHI; BLASCHEK, 2001; ZHENG et al., 2015). Comparado ao etanol e outros combustíveis derivados de

fermentação o butanol é considerado um combustível superior e com grande potencial para substituir a gasolina, pois além de suas excelentes características, não seria necessário modificar as tecnologias dos motores de veículos atuais e nenhuma outra estrutura existente como tanques, tubulações e bombas de armazenamento (DÜRRE, 2007; PAPOUTSAKIS, 2008; KRAEMER et al., 2011). Além disso, dentre as suas características tem-se a melhor miscibilidade com a gasolina, em qualquer proporção (KRAEMER et al., 2011; ABDEHAGH; TEZEL; THIBAUT, 2014).

Fermentação ABE é realizada por diversas linhagens de *Clostridium* sp., em sua maioria por *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* e *Clostridium saccharoperbutylicum* a partir de diversas fontes lignocelulósicas, as quais podem necessitar de pré-tratamento antecedente à fermentação como moagem, peneiramento, centrifugação e sacarificação (QURESHI; BLASCHEK, 2001; GREEN, 2011; KRAEMER et al., 2011; ABD-ALLA; ELSADEK EL-ENANY, 2012).

Em uma fermentação em batelada, a concentração de solvente total pode chegar ao máximo em 20 g/L e a proporção de solvente geralmente é 3:6:1 (acetona-butanol-etanol), ao passo que, quando são utilizadas cepas modificadas como *Clostridium beijerinckii* BA101 a concentração total de solventes pode chegar a 33 g/L (CHEN; BLASCHECK, 1999; QURESHI; BLASCHEK, 2001). Bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. são capazes de utilizar açúcares simples e complexos como pentoses e hexoses, oriundos do tratamento da biomassa, bem como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrogênio (H<sub>2</sub>) e monóxido de carbono (CO) (MUNASINGHE; KHANAL, 2011; TRACY et al., 2012).

Diante deste cenário o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do bagaço de laranja industrial peletizado, livre de terpenos e óleos essenciais, na fermentação ABE visando a produção de butanol utilizando a cepa *Clostridium beijerinckii*. A biomassa foi caracterizada e submetida a pré-tratamentos de modo a avaliar a melhor condição para fermentação ABE e sua utilização para esta finalidade foi inédita.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomassa lignocelulósica

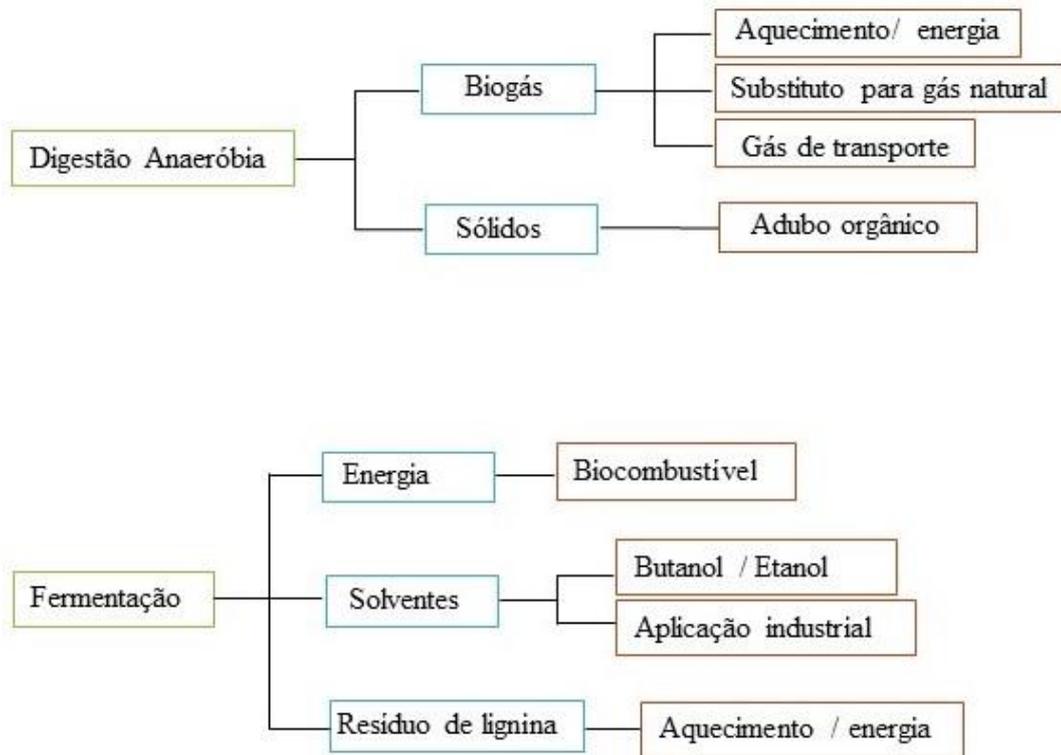
Biomassa engloba toda matéria orgânica de origem animal ou vegetal, sendo a biomassa lignocelulósica, proveniente de fontes vegetais e do seu processamento, como resíduos agroindustriais. Essas biomassas são compostas majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina, e podem ser provenientes das indústrias, da agricultura, das florestas e das águas além dos resíduos sólidos municipais (Quadro 1) (MCKENDRY, 2002; PÉREZ et al., 2002; VERTES; QURESHI; EDS, 2011). Quando esta é proveniente do resíduo de frutas é constituída principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (SÁNCHEZ et al., 2014). É uma potencial fonte de energia renovável, diversa, quimicamente complexa e está sendo cada vez mais utilizada de modo a diminuir o consumo dos combustíveis fósseis, e sua aplicação é abrangente, pois pode ser utilizada para produção de biocombustíveis, biossurfactantes, solventes orgânicos, aditivos na indústria farmacêutica e alimentícia etc (Figura 1) (RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013; COLLARD; BLIN, 2014; CAI et al., 2017).

**Quadro 1.** Biomassa lignocelulósica e suas principais fontes.

Fonte	Biomassa lignocelulósica	Exemplos
<b>Agricultura</b>	Resíduos das plantações açúcar e amido	Cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo, haste de algodão, milho etc.
<b>Florestas</b>	Subprodutos florestais	Eucalipto, álamo, casca, blocos de madeira etc.
<b>Indústrias</b>	Resíduos agroindustriais, madeira de resíduo industrial	Casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, espiga de milho, bagaço de frutas, serragem etc.
<b>Municípios</b>	Resíduos domésticos e de prefeituras	Gramma, restos de podas, resíduos vegetais domésticos em geral etc.
<b>Águas</b>	Plantas aquáticas e algas	-

Fonte: adaptado de (CAI et al., 2017).

**Figura 1.** Conversão bioquímica de biomassa lignocelulósica.



Fonte: modificado de Cai et al. (2017)

Em meio a uma grande diversidade, as melhores fontes de biomassa lignocelulósica são justamente aquelas que estão se tornando cada vez mais preocupantes economicamente e ambientalmente, como os resíduos agroindustriais, principalmente os do processamento de frutos (RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013)

Celulose, hemicelulose e lignina são os principais componentes das células vegetais, estão fortemente ligados e dependendo do tipo de biomassa lignocelulósica, são encontrados e organizados de maneira e proporção diferentes (Tabela 1). O grande desafio da utilização da biomassa lignocelulósica é justamente promover a conversão de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis e a extração da lignina (MCKENDRY, 2002; ISIKGOR; BECER, 2015).

**Tabela 1.** Diferentes tipos de biomassa lignocelulósica e suas composições de celulose, hemicelulose e lignina.

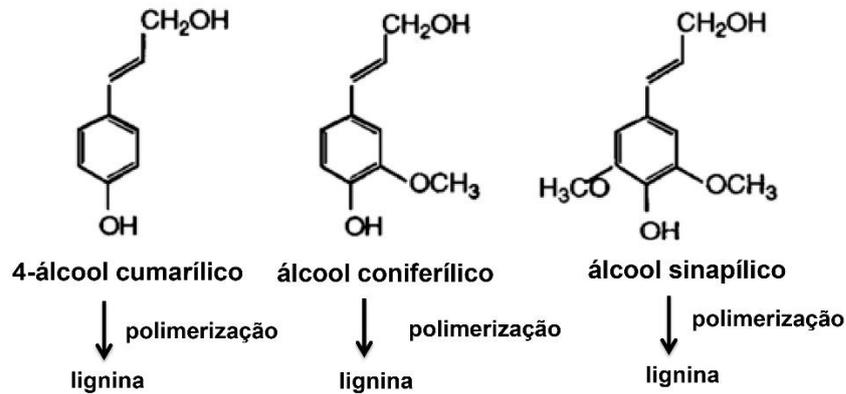
Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Palha de trigo	35-39	23-30	12-16	
Palha de arroz	29,2-34,7	23-25,9	17-19	
Bagaço de cana-de-açúcar	25-45	28-32	15-25	
Espiga de milho	33,7-41,2	31,9-36	6,1-15,9	Isikgor; Becer (2015)
Palha de aveia	31-35	20-26	10-15	
Palha de cevada	36-43	24-33	6,3-9,8	
Gramínea	25-40	25-50	10-30	
Bagaço de laranja	33,98	9,99	6,93	Rivas-Cantu; Jones; Mills (2013)
Feijão verde	17	16	8	
Eucalipto	54,1	18,4	21,5	Isikgor; Becer (2015)

A celulose de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é um polímero formado por subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas sendo a sua unidade de repetição denominada celobiose (MCKENDRY, 2002; XU et al., 2013). Apresenta-se em microfibrilas devido às fortes ligações de hidrogênio e força de *Van der Waals* e na biomassa lignocelulósica a celulose pode estar em sua forma cristalina, mais abundante e com característica mais rígida, ou amorfa, a qual fica mais vulnerável à degradação enzimática (BÉGUIN; AUBERT, 1994; KUMAR et al., 2009).

A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado e heterogêneo, sendo constituída por vários polímeros como xilose, arabinose, manose e outros tipos de pentoses, que são bem mais facilmente hidrolisáveis do que o encontrado na celulose. A hemicelulose é ligada por ligações não-covalentes em cada microfibrila de celulose (MCKENDRY, 2002; PÉREZ et al., 2002; KUMAR et al., 2009; XU et al., 2013).

A lignina é um polímero fenólico, uma molécula amorfa de alto peso molecular que preenche os espaços entre a celulose e a hemicelulose na parede celular vegetal e confere rigidez, resistência a ataques microbianos e impermeabilidade à célula. É formada a partir da polimerização de três monômeros de álcoois denominados monolignóis (Figura 2): álcool *p*-cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico (FREUDENBERG, 1959; WHETTEN et al., 1998; MOHANTY; MISRA; HINRICHSEN, 2000; MCKENDRY, 2002)

**Figura 2.** Estrutura dos monolignóis precursors da lignina.

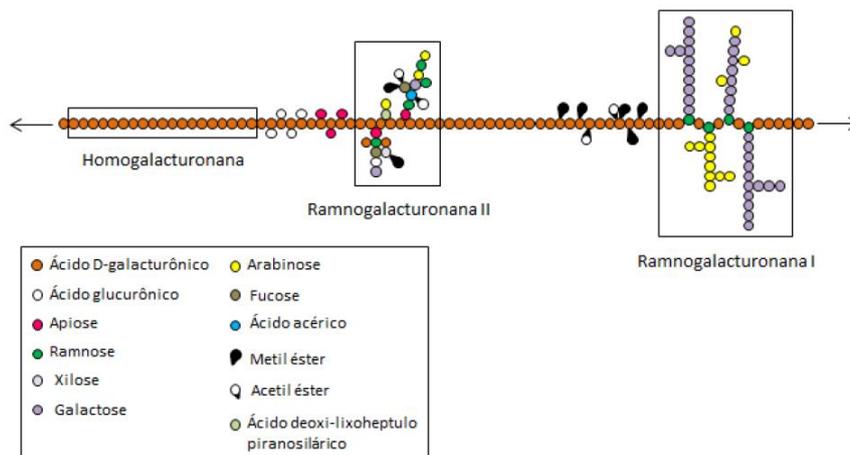


Fonte: adaptado de Whetten et al. (1998).

A alta dificuldade de promover a hidrólise da biomassa lignocelulósica está atrelada à forte ligação da lignina entre a celulose e a hemicelulose e sua alta resistência à biodegradação (BÉGUIN; AUBERT, 1994; KUMAR et al., 2009; TEMPLETON et al., 2010).

A pectina é um polissacarídeo complexo presente nas células vegetais, mais precisamente, um polímero natural heteropolissacarídeo ácido coloidal com alta diversidade estrutural, ela está relacionada à resistência mecânica das plantas juntamente com a hemicelulose e celulose (COSGROVE; JARVIS, 2012). Quanto a sua estrutura química é formada por ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas parcialmente esterificados por grupos metil éster. É formada principalmente por três elementos estruturais (Figura 3): homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II onde L-ramnose, D-galactose, L-arabinose e outros 13 diferentes monossacarídeos podem estar ligados através de 20 ligações diferentes (SOUSA et al., 2014; NAQASH et al., 2017).

**Figura 3.** Esquema estrutural da pectina.



Fonte: Adaptado de CANTERI et al. (2012).

A pectina, por apresentar a capacidade de reter água para formar géis em baixa concentração, é amplamente utilizada pela indústria alimentícia como agente gelificante, agente espessante ou estabilizante. As fontes industriais de pectina são os resíduos do processamento de alimentos que incluem a casca de cítricos, bagaço de maçã, beterraba e cascas de mamão. Em especial a polpa cítrica possui uma grande quantidade de pectina (25-30 %), sendo muito valorizada sua extração e comercialização (NAQASH et al., 2017; WANG et al., 2018).

## 2.2 Laranja

A laranja é uma fruta cítrica, pertencente ao gênero *Citrus* que engloba diversos outros frutos como a tangerina, a toranja, a lima e o limão. Dentro deste grupo a laranja é a mais produzida, representando 61 % da produção mundial.

Apesar das diversas variedades de laranja (*Citrus sinensis*), ela é classificada em três grandes grupos: laranjas comuns ou laranjas brancas; laranjas de umbigo e laranjas pigmentadas ou sanguíneas. As denominadas laranjas comuns são aquelas destinadas à produção de suco, entre elas estão as variedades Valência e Pera.

As laranjas de umbigo, que levam esta denominação por apresentarem uma estrutura que se assemelha a um umbigo humano, são representadas pelas variedades Bahia e Cara Cara entre outras, e são destinadas ao consumo *in natura* devido sua textura e riqueza de sabor. As laranjas pigmentadas apresentam alta concentração de antocianina que conferem à casca, polpa e suco da fruta uma coloração mais avermelhada, estão em todo o mundo mas são cultivadas principalmente na Itália e Espanha nas variedades Sanguina e Sanguinella (AZNAR, 1999; STINCO et al., 2016; SATARI; KARIMI, 2018).

Os países que mais produzem frutas cítricas no mundo são Brasil, China, Índia, México, Espanha e EUA totalizando mais de dois terços da produção mundial (PAGGIOLA et al., 2016). O resíduo do processamento cítrico possui elevado teor de matéria orgânica (95 % do total de sólidos) e grande quantidade de água (cerca de 90 %), sendo o bagaço de laranja o produto residual agroindustrial de processamento de frutos mais gerado. Por ser rico em matéria orgânica e altamente fermentável, este não deve ser descartado no meio ambiente. Parte deste resíduo pode ser reciclado como fertilizante orgânico no solo, tendo sua aplicação controlada para cada tipo de solo e cultivo ou pode ser desidratado e destinado à alimentação animal (GUERRERO et al., 1995; POURBAFRANI et al., 2007).

Esses resíduos do processamento da laranja são constituídos pela casca, polpa, sementes e resíduos líquidos, compostos por proteínas, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012; SANTOS et al., 2015). Em sua

forma peletizada o bagaço de laranja industrial também pode ser destinado à alimentação animal, principalmente para ruminantes e está associada à ingestão de fibras (VILLARREAL et al., 2006).

O resíduo cítrico sólido é rico em açúcares solúveis como frutose, glicose e sacarose, e insolúveis como celulose, hemicelulose e pectina, além de compostos como lignina, flavonoides, óleos essenciais, lipídios e vitaminas (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2004). Estes polímeros insolúveis podem ser hidrolisados enzimaticamente por celulase,  $\beta$ -glucosidase, xilanase e pectinase, em suas formas de carboidratos simples correspondentes, e juntamente com os demais açúcares solúveis compõem uma excelente fonte para a conversão biológica de biocombustíveis. Em contrapartida, o extrativo denominado *D*-limoneno presente nesta biomassa, mesmo em baixas concentrações é tóxico para atividade microbiana e precisa ser removido antes de qualquer tipo de fermentação, na indústria o mesmo é retirado antes do processo de peletização pois pode ser utilizado como flavorizante (POURBAFRANI et al., 2007; LOHRASBI et al., 2010; RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013). A Tabela 2 apresenta a composição aproximada de alguns dos principais subprodutos gerados na indústria a partir do processamento de cítricos.

**Tabela 2.** Subprodutos do processamento de cítricos (% em base seca).

Resíduo	Cinzas	Açúcares	Gorduras	Proteína	Flavonoide	Pectina	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Fonte
Limão	2,52	6,52	1,51	7,00	12,54	13,00	7,56	23,06	8,09	Marin et al. (2007)
Laranja	2,56	9,57	4,00	9,06	4,50	23,02	7,52	37,08	11,04	Marin et al. (2007)
Tangerina	3,23	31,58	-	5,78	-	22,60	0,56	10,10	4,28	Oberoi et al. (2011)

O uso de resíduos de cítricos parece ser interessante na produção de biocombustíveis uma vez que seu conteúdo de lignina é baixo, sendo mais facilmente hidrolisado em relação a outras fontes de biomassa lignocelulósica agroindustrial, como o bagaço de cana-de-açúcar e cereais (MARÍN et al., 2007; RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013).

Para a produção de biocombustíveis os resíduos de laranja, assim como qualquer outro tipo de biomassa lignocelulósica, necessita passar por um pré-tratamento, o qual permite uma maior quantidade de carboidratos complexos presentes na parede celular a sofrerem hidrólise ou até mesmo para remover inibidores da fermentação. Os produtos de degradação como fragmentos de lignina e furfural, ou até mesmo os compostos de biomassa solubilizada como

ácido acético, são inibidores microbianos que inviabilizam a fermentação e devem ser removidos (OGEDA e PETRI, 2010). Na hidrólise, seus carboidratos complexos são quebrados em açúcares simples e assim mais fáceis para serem fermentados (PÉREZ et al., 2002; CHOI et al., 2013; JOHN et al., 2017).

### *2.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica*

Existem muitos processos de pré-tratamentos que podem ser utilizados na biomassa lignocelulósica, e é nesta etapa que pode elevar os custos da utilização dessas biomassas. Estes pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, físico-químicos seguido de biológicos e biológico sendo que cada tipo possui suas vantagens e desvantagens, seja ela ambiental ou econômica (HEITZ et al., 1991; WYMAN et al., 2005; SØRENSEN et al., 2008).

Os pré-tratamentos físicos englobam todos os tipos de moagem mecânica, termólise como a autohidrólise ou hidrotermólise, irradiação como o ultrassom e micro-ondas e explosão a vapor e atuam de forma a aumentar a porosidade da biomassa, proporcionando uma maior superfície de contato, porém é um processo que demanda gasto de energia elétrica (WYMAN et al., 2005; ZAEB et al., 2017).

Quimicamente, o pré-tratamento pode utilizar bases ou ácidos ou ainda uma combinação deles com solventes, podendo estar diluídos ou não e estarem atrelados a baixas ou altas temperaturas. Dentre os ácidos mais utilizados estão ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e ácido nítrico ( $HNO_3$ ) bases como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de amônia ( $NH_4OH$ ) e hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$ ), podendo gerar grandes quantidades de resíduos (HEITZ et al., 1991; WYMAN et al., 2005; SØRENSEN et al., 2008).

Os pré-tratamentos físico-químicos podem otimizar o processo de remoção da lignina e a diminuição da cristalinidade da celulose, estes podem ser denominados como, explosão de fibras de amônia, amônia-aquosa, oxidação úmida dentre outras (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; ZABED et al., 2017).

Biologicamente o pré-tratamento é realizado com microrganismos celulolíticos, em especial os fungos, tendo como desvantagem aos demais a demanda maior de tempo de ação e incubação (SARKAR et al., 2012; ZABED et al., 2017).

Todos os pré-tratamentos são importantes, sendo que cada um possui sua vantagem e desvantagem e deve ser analisado para cada tipo de biomassa em que será aplicado, eles auxiliam a reduzir a cristalinidade da celulose e separar a matriz de lignina para então poder

sofrer um processo hidrolítico (QURESHI et al., 2008). O Quadro 2 apresenta as vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos.

**Quadro 2.** Vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica.

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Ácido</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto rendimento de glicose</li> <li>• Baixa formação de inibidores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo devido ao uso de equipamento mais sofisticado para evitar corrosão</li> <li>• Alto custo na recuperação do ácido</li> </ul>
<b>Moagem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta a superfície de contato da biomassa</li> <li>• Pode reduzir cristalinidade da celulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não elimina a lignina</li> <li>• Pode não aumentar a concentração de açúcar</li> </ul>
<b>Explosão à vapor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto rendimento de açúcares</li> <li>• Muito bom quando aplicado as madeiras macias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não elimina lignina</li> <li>• Forma produtos de degradação</li> </ul>
<b>Biológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viável para materiais com alto teor de carboidratos</li> <li>• Remove lignina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os microrganismos consomem os açúcares liberados</li> <li>• Processo demorado</li> </ul>
<b>Ultrassom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta a porosidade</li> <li>• Erosão e desgastes das partículas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gasto de energia</li> <li>• Pode não aumentar a concentração de açúcar</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Lucy; Petri (2010).

#### 2.4 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática ocorre a sacarificação, na qual os carboidratos complexos são convertidos em monossacarídeos simples (VERTES; QURESHI; EDS, 2011). Normalmente o rendimento de açúcares de uma hidrólise enzimática é em torno de 20 %, ao passo que quando aplicada após algum pré-tratamento realizado na biomassa, o rendimento pode ultrapassar os 90 % (MOSIER et al., 2005; FERREIRA et al., 2009).

A hidrólise enzimática quando comparada às hidrólises ácida e alcalina (hidrólise química), apesar de ser um processo caro, possui menor toxicidade e não gera subprodutos que possam ser inibidores na fermentação (FERREIRA et al., 2009).

Para que a hidrólise enzimática ocorra de maneira eficaz, é necessário que as enzimas estejam em condições ótimas de pH e temperatura. As celulasas por exemplo, possuem sua maior atividade quando expostas numa faixa de temperatura de 40 a 50 °C e pH entre 4,5 e 5. Xilanases possuem boa atividade em pH 4-5 e 50 °C (PARK et al., 2002).

As celulasas são um complexo enzimático composto geralmente por endoglucanases, celobio-hidrolases e glucosidases, as quais atuam sinergicamente nas regiões cristalinas da celulose, e atuam na quebra das cadeias de celobiose até glicose. As hemicelulasas também são um complexo de enzimas, que podem ser muito diversas dependendo do resíduo de açúcar principal, pois a hemicelulose é composta por muitos açúcares. Dentre suas inúmeras enzimas estão as xilanases, arabinases, mananases, manosidases, galactosidases etc. Enquanto as celulasas geram glicose, a partir das hemicelulasas obtêm-se pentoses e hexoses (JØRGENSEN; KUTTER; OLSSON, 2003).

### 2.5 *Clostridium sp*

Pertencente ao filo Firmicutes, o gênero *Clostridium* foi descrito em 1880 e engloba aproximadamente 100 espécies que possuem importância tanto médica quanto industrial (TRACY et al., 2012; BLASCHEK, 2014; WALKER et al., 2016). As espécies pertencentes a este gênero são bactérias anaeróbias ou microaerófilas, gram-positivas, incapazes de realizar a redução dissimilatória de sulfato, em sua maioria são móveis por flagelos e formadoras de endósporos, os quais são altamente resistentes ao calor. Esses microrganismos são encontrados em praticamente todos os habitats anaeróbios que incluem solo, sedimentos aquáticos, plantas e em tecidos como o trato intestinal de animais (TRACY et al., 2012; BLASCHEK, 2014).

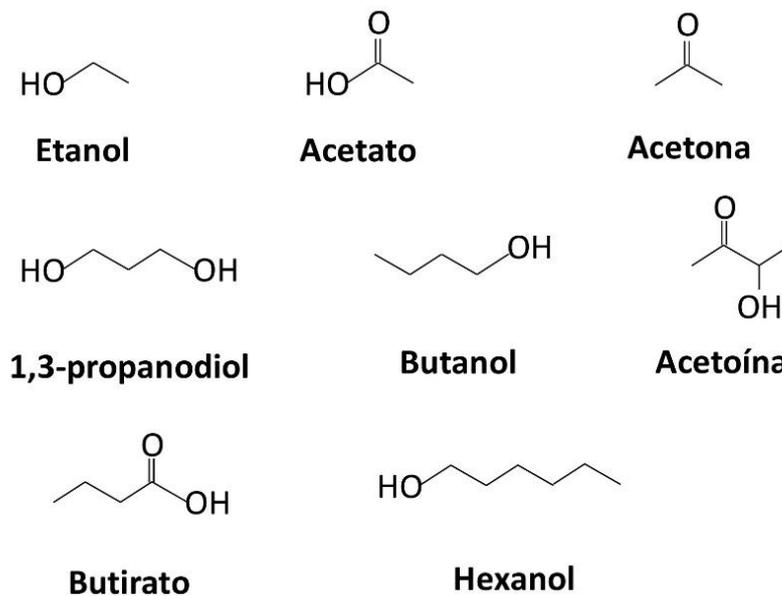
Espécies de *Clostridium sp* produzem diversas exoproteínas, das quais muitas atuam como fatores de virulência, sendo que as principais espécies de importância médica são *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* e *Clostridium difficile* (BLASCHEK, 2014).

No campo industrial, os clostrídios possuem uma grande importância por produzirem diversas enzimas extracelulares (celulolíticas, amilolíticas etc.) capazes de degradar uma gama de moléculas orgânicas que incluem diversos grupos de polissacarídeos, como celulose, hemicelulose, pectina e amido, viabilizando assim, a utilização de diferentes biomassas como substrato na fermentação o que acaba promovendo uma excelente destinação dos resíduos agrícolas (MITCHELL, 1992; TRACY et al., 2012).

Clostrídios possuem interesse biotecnológico pois podem utilizar ampla variedade de fonte de carbono, produzem diversos metabólitos de interesse industrial e em geral, toleram substâncias tóxicas, muitas vezes inibidoras para outros microrganismos (TRACY et al., 2012). A partir da fermentação ABE realizada principalmente por espécies deste gênero, é possível obter ácidos orgânicos e solventes muito utilizados na indústria, cepas comumente utilizadas são consideradas solventogênicas e as principais utilizadas são *Clostridium acetobutylicum*,

*Clostridium beijerinckii* e *Clostridium aurantibutyricum*. Dentre os subprodutos da fermentação estão ácido butírico, ácido acético, bem como a produção de solventes como acetona, butanol e etanol (Figura 4) (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003; BLASCHEK, 2014; YANG et al., 2018).

**Figura 4.** Alguns produtos de interesse industrial gerados a partir do metabolismo de espécies de *Clostridium* sp.



Fonte: Adaptado de TRACY et al. (2012)

### 2.6 Fermentação acetona-butanol-etanol (ABE)

A fermentação ABE é um tipo de fermentação anaeróbia e tem como produto final os solventes acetona, butanol e etanol e como subprodutos os ácidos orgânicos como ácido butírico e acético, gases como H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003).

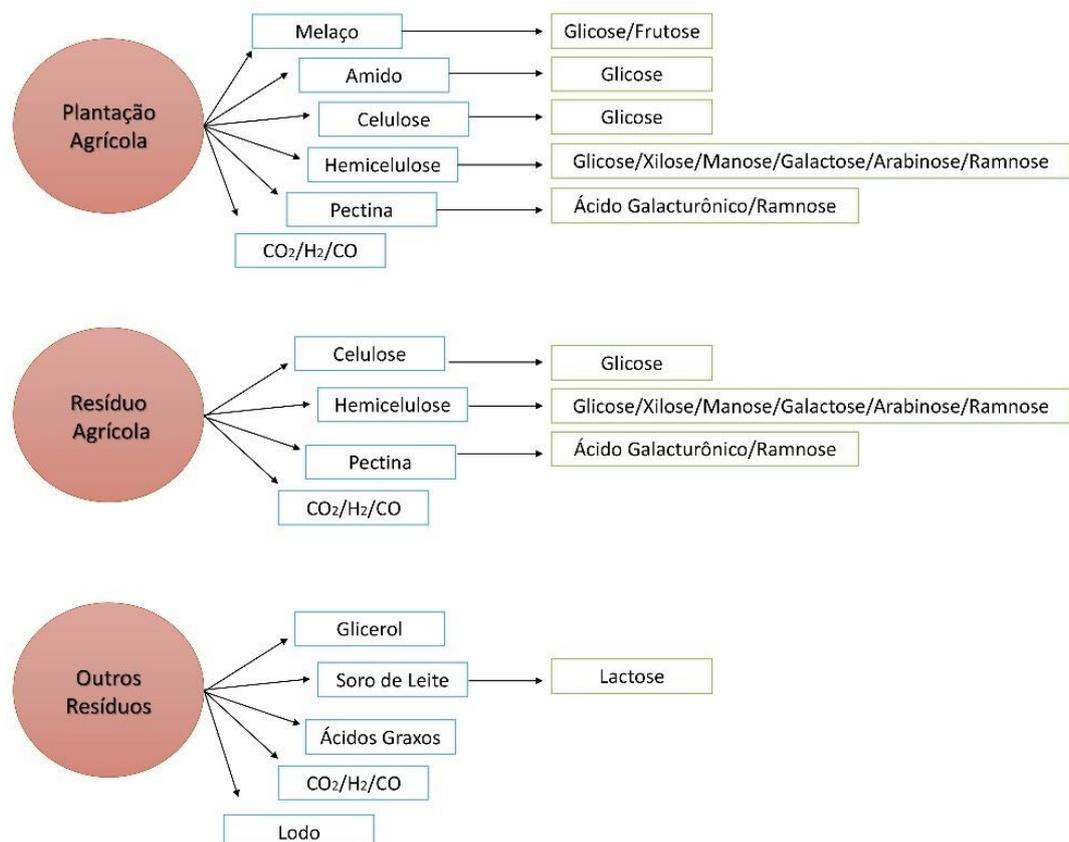
A produção da fermentação ABE em larga escala deu-se durante a Primeira Guerra Mundial, onde países como Canadá, Grã-Bretanha e Estados Unidos precisavam suprir seu estoque de cordite (pólvora britânica) o qual era fabricado a partir da acetona (GABRIEL; CRAWFORD, 1930). Durante o pós-guerra e com o desenvolvimento do setor automobilístico, na década de 1920 o butanol ganhou prestígio, pois o acetato de butila, seu derivado, era utilizado como solvente para diversos tipos de vernizes e polimentos de secagem para acabamento de carros. Porém, após 1945 a indústria da fermentação ABE perdeu para a indústria petroquímica devido a competitividade econômica, por apresentar preços mais altos

e baixo rendimento na produção, e então a síntese química do butanol passou a ser mais atrativa (DÜRRE, 1998).

Nos últimos anos, com a busca por novas fontes renováveis de energia e a crescente preocupação com o meio ambiente, a fermentação biológica ABE voltou a ser de interesse industrial para a fabricação de butanol a partir de fontes renováveis. A exemplo estão as empresas British Petroleum e a multinacional americana DuPont que juntas iniciaram em 2006 o reestabelecimento da produção de butanol e atualmente o Butamax, nome comercial do butanol produzido, já é comercializado no mundo e é feito a partir da cana-de-açúcar no Brasil, do milho nos EUA e do trigo na Comunidade Europeia (ZVERLOV et al., 2006; DÜRRE, 2007).

A produção de butanol a partir de fonte renovável torna-se viável pois as bactérias solventogênicas do gênero *Clostridium* conseguem metabolizar tanto pentoses quanto hexoses, (Figura 5) (JONES; WOODS, 1986; TASHIRO; TAKEDA; KOBAYASHI, 2004; RAGANATI et al., 2015).

**Figura 5.** Diferentes resíduos com seus substratos gerados e suas subunidades monoméricas primárias diversas que podem ser fermentadas por *Clostridium* sp.



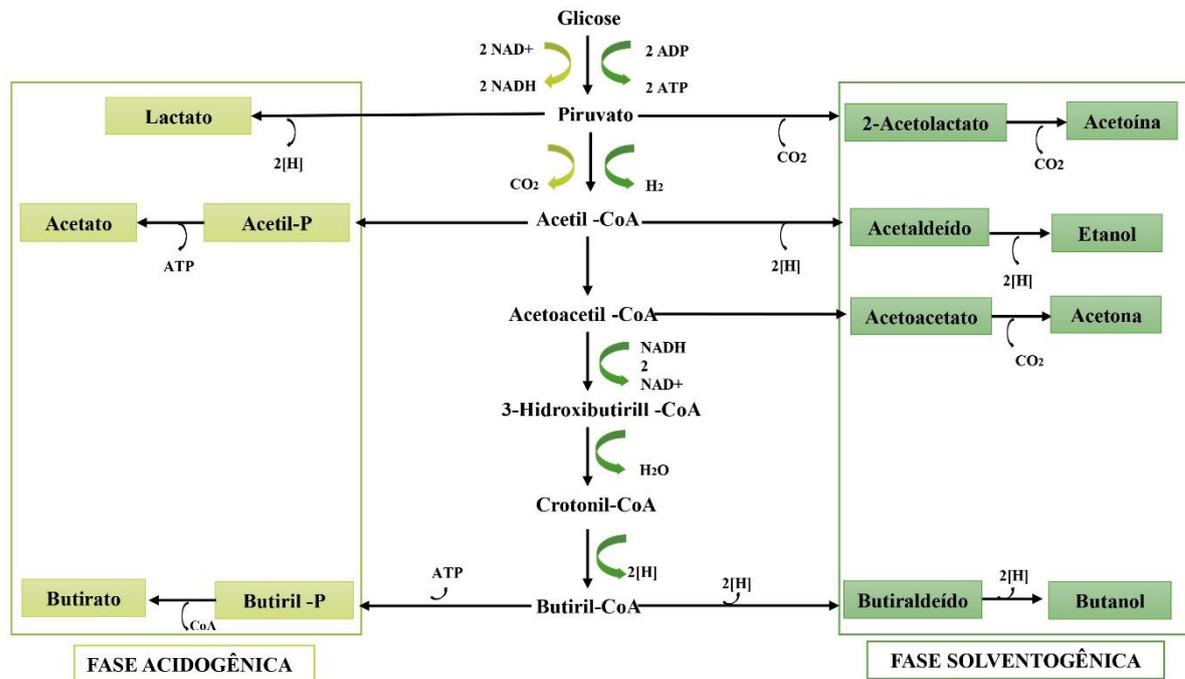
Fonte: modificado de Tracy et al. (2012)

A fermentação ABE pode ser dividida em duas fases (Figura 6):

1) acidogênica - geralmente é marcada pelo crescimento exponencial da bactéria, é a primeira etapa da fermentação, onde as vias formadoras de ácidos são ativadas e seus principais produtos são acetato, butirato, hidrogênio e dióxido de carbono.

2) solventogênica – os ácidos são assimilados e utilizados para a formação de acetona, butanol e etanol e esta etapa ocorre pouco antes da fase estacionária de crescimento (JONES; WOODS, 1986; LEE et al., 2008; UYTTEBROEK; VAN HECKE; VANBROEKHOVEN, 2015).

**Figura 6.** Via fermentativa acetona-butanol-etanol por *Clostridium* sp.



Fonte: modificado de Nanda et al. (2017).

A produção de butanol a partir da fermentação ABE ainda apresenta algumas dificuldades como: toxicidade do butanol para as células microbianas; baixa produtividade; alto custo da matéria-prima (glicose) e o custo da recuperação do solvente a partir do caldo fermentativo. Para isso é muito importante o desenvolvimento de novos meios para produção, o uso de recursos renováveis como substrato bem como o aproveitamento de diferentes biomassas, o desenvolvimento de novas estratégias fermentativas e a viabilização da recuperação do solvente (DÜRRE, 2007; NAPOLI et. al. 2017).

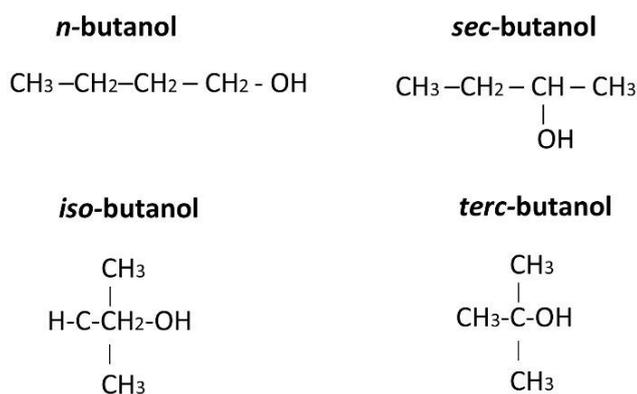
Dado que grandes concentrações de solventes podem ser tóxicas para a cepa, a engenharia genética busca através do sequenciamento identificar genes que podem estar envolvidos na solventogênese, como em *C. beijerinckii* 8052 uma cepa sequenciada, onde foram encontrados oito diferentes genes relacionados à fermentação solventogênica e sugere-se que a instabilidade de alguns desses genes podem estar relacionados à degeneração da estirpe. Mutantes utilizados atualmente na indústria como *C. beijerinckii* BA101 (patente U.S. 6358717) o qual foi desenvolvido a partir de mutagênese química, é considerada uma cepa produtora de hiperbutanol, pois tolera maiores concentrações do solvente (BLASCHEK, 2014).

Cepas geneticamente modificadas já conseguem tolerar maiores concentrações de solventes, consequentemente aumentando a produtividade de butanol e diminuindo a formação de subprodutos que afetam a fermentação, incluindo a diminuição de acetona e etanol, porém a engenharia genética ainda enfrenta o desafio de desvendar a regulação genômica induzida desta cepa que apresenta características únicas (ZHENG et al., 2009; DELLOMONACO; FAVA; GONZALEZ, 2010; NANDA et al., 2017; YANG et al., 2017, 2018).

### 2.7 Butanol

Butanol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH) é um álcool orgânico primário de quatro carbonos e possui quatro isômeros denominados *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol e *terc*-butanol (Figura 7). É importante na fabricação de químicos como tintas, polímeros, plastificantes, solubilizantes na indústria têxtil e na extração de ativos fármacos e cosméticos (DÜRRE, 2007). Suas principais características são alto teor de energia, baixa volatilidade, alta octanagem, baixa pressão de vapor, ser menos higroscópico, menos corrosivo, miscibilidade com a maioria dos solventes e menor toxicidade (NANDA et al., 2017). O seu valor energético é 30 % maior em relação ao etanol e 10 % menor que a gasolina, a Tabela 3 apresenta algumas propriedades do butanol em comparação com o etanol e a gasolina.

**Figura 7.** Isômeros do butanol.



**Tabela 3.** Propriedades dos combustíveis butanol, etanol e gasolina.

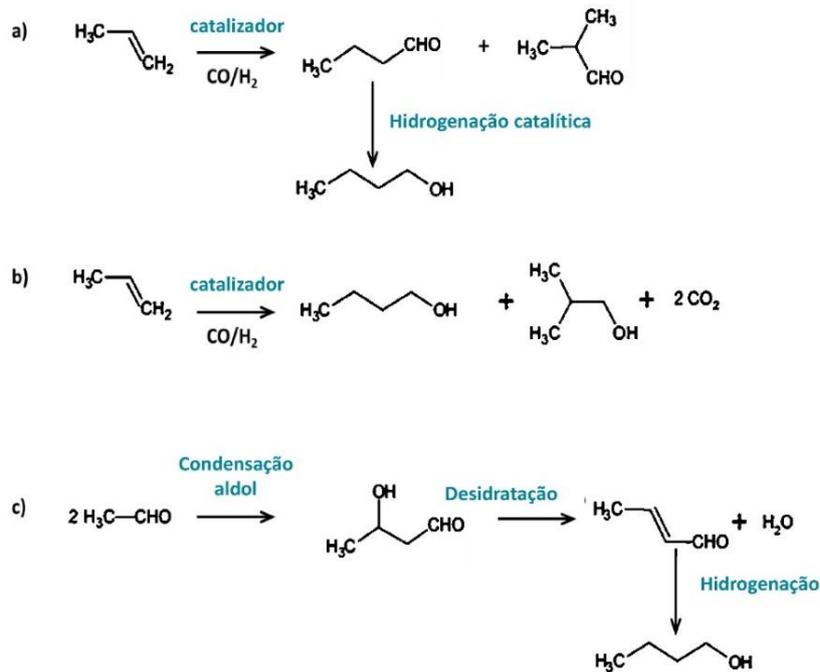
Propriedade	Butanol	Etanol	Gasolina
Fórmula química	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	H, C <sub>4</sub> -C <sub>12</sub>
Peso molecular (g/mol)	74,12	46,07	114,23
Relação ar-combustível	11,2	9	14,7
Densidade de energia (MJ/L)	29,2	21,2	32,5
Número de octanas pesquisa	96	129	91-99
Número de octanas motor	78	102	81-89
Solubilidade em água (%) à 25°C	7,3	100	-
Teor de oxigênio (%)	22	35	0
Ponto de fusão (°C)	-89,8	-114	-56,6
Ponto de ebulição (°C)	117,4	78,4	125

Fonte: adaptado de Lee et al. (2008); Nanda et al. (2017).

O calor de combustão do butanol é cerca de 80 % em relação à gasolina, enquanto os valores para etanol e metanol são aproximadamente 65 e 45 %, respectivamente (ABDEHAGH; TEZEL; THIBAUT, 2014). O butanol é menos corrosivo que o etanol, com baixa pressão de vapor e menor volatilidade, sendo mais seguro do que os demais álcoois inferiores (ABDEHAGH; TEZEL; THIBAUT, 2014).

A obtenção do butanol a partir de processos petroquímicos pode ocorrer de três formas (Figura 8): oxo síntese (hidroformilação), síntese de Reppe e hidrogenação do crotonaldeído. No processo de oxo síntese (principal via de obtenção) a hidroformilação do propeno resulta na formação de aldeídos que são hidrogenados e na presença de catalisadores obtêm-se 1-butanol e 2 metilpropanal e a partir deles, seus álcoois correspondentes. A síntese de Reppe consiste na carbonilação do propeno, e este acrescido de monóxido de carbono e água reagem na presença de um catalisador gerando 1-butanol e 2-metil-1-propanol na proporção de 86:14, respectivamente. E a hidrogenação do crotonaldeído ocorre a condensação seguida de desidratação e hidrogenação de acetaldeído (LEE et al., 2008; HAHN et al., 2013; VAN DER MERWE et al., 2013).

**Figura 8.** Síntese química do butanol. (a) Oxo síntese, (b) Processo de Reppe, (c) Hidrogenação do crotonaldeído.



Fonte: modificado de Lee et al. (2008).

A biomassa lignocelulósica vem sendo cada vez mais utilizada na fermentação ABE de modo a substituir a glicose que é mais cara e também pelo fato de ser uma forma de reaproveitar o que seria descartado.

Bellido et al (2015), utilizando polpa de beterraba como fonte de carbono obtiveram maiores concentrações de açúcares livres para a fermentação ABE após a biomassa passar pelo pré-tratamento de autohidrólise que após 120 h de fermentação resultou em 7,8 g/L de butanol.

Sasaki et al (2014) utilizaram em seu experimento apenas o pré-tratamento mecânico (moagem) para o fruto do carvalho (bolotas) e obtiveram um rendimento de 9,4 g/L de butanol em 120 h de fermentação. Este fruto é rico em amido e não necessitou de outro pré-tratamento pois a cepa utilizada *C. acetobutylicum* (NBRC 13948) possui atividade amilolítica. Diferentemente do que foi realizado com o cavaco de carvalho, que por ser composto principalmente por celulose, precisou ser moído, tratado por explosão a vapor seguido de hidrólise enzimática para obter 7,77 g/L de butanol após 144 h de fermentação.

Ainda quando a glicose é utilizada como substrato, dependendo do tipo de reator, o tempo de fermentação e o tipo de cepa, o rendimento ABE (g/L) é maior. Muitos trabalhos utilizam a glicose como controle positivo ao testarem novos substratos como Li et al (2017)

que testaram a produção de butanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e compararam com a produção utilizando glicose e uma outra mistura de glicose mais xilose como substrato. Além disso, muitas vezes o substrato conhecido, como a glicose, é utilizado quando o objetivo proposto é testar algum método novo como: extração do solvente, fermentação seguida de extração, comparação entre fermentação contínua e batelada dentre outros. Ezeji, Qureshi; Blaschek (2003) compararam a produção ABE e a recuperação de solvente, utilizando glicose como substrato, entre uma fermentação em batelada integrada à recuperação por gás de arraste com outra fermentação sem processo de extração integrado e obtiveram um rendimento ABE (g/L) de 33 % a mais no modelo integrado. A Tabela 4 apresenta alguns trabalhos que visaram a obtenção de butanol a partir da fermentação ABE.

**Tabela 4.** Obtenção de butanol a partir da fermentação ABE com diversas biomassas lignocelulósicas.

<b>Biomassa lignocelulósica</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Butanol (g/L)</b>	<b>ABE (g/L)</b>	<b>Fonte</b>
Fibra de milho	<i>C. beijerinckii</i> BA101	6,40	9,30	Qureshi et al. (2008)
Alga verde	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	11,40	18,10	Wal et al. (2013)
Fibra de milho	<i>C. beijerinckii</i> RT66	7,50	12,90	Guo et al. (2013)
Fruto do carvalho	<i>C. acetobutylicum</i> NBRC 13948	9,40	13,70	
Beterraba	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	7,80	-	Bellido et al. (2015)
Eucalipto	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4 ATCC 13564	11,50	16,90	Zheng et al. (2017)
Sorgo	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	7,91	12,25	Jafari et al. (2017)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>C. acetobutylicum</i> CH02	7,68	12,12	Li et al. (2017)
Bagaço de maçã	<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	9,11	-	Hijosa-Valsero et al. (2017)
Batata doce	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	6,40	-	He et al., (2017)
Grão de cevada	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	6,60	8,60	Plaza et al. (2017)
Alface	<i>C. acetobutylicum</i> DSMZ 729	1,10	1,44	Procentese et al. (2017)

### 3. OBJETIVOS

Avaliar a produção de butanol via fermentação ABE a partir de bagaço de laranja industrial peletizado utilizando cultura pura de *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132).

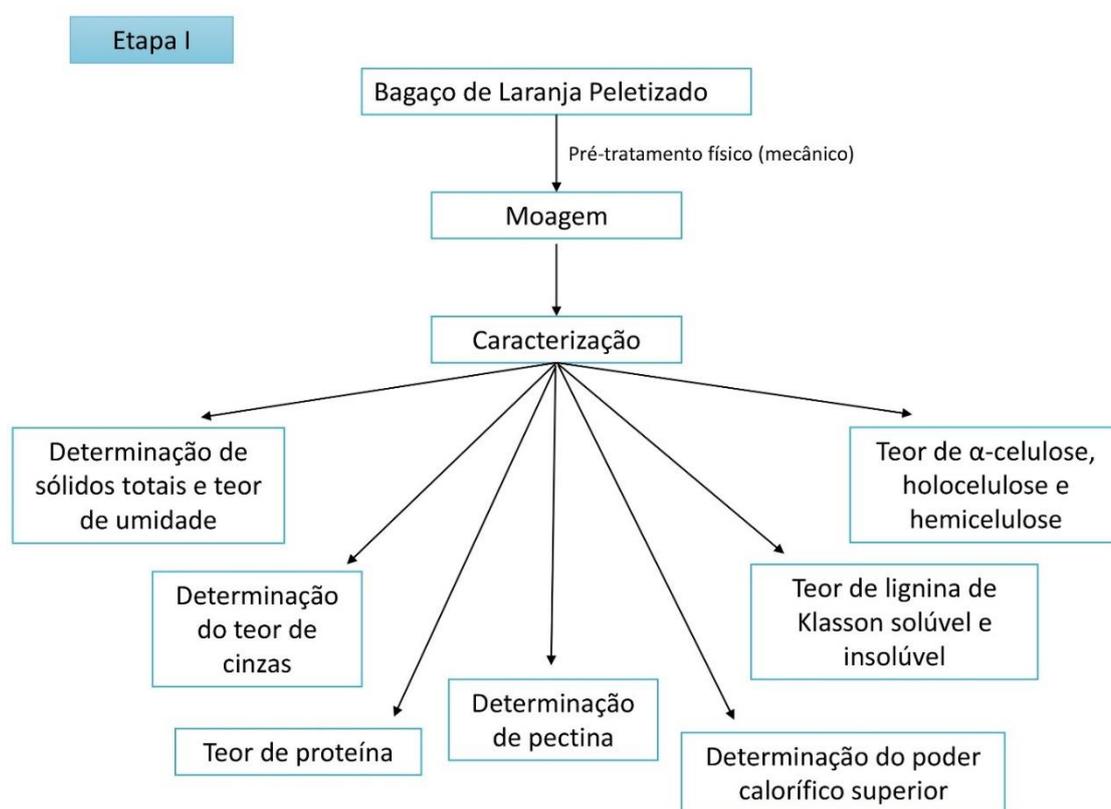
#### 3.1 *Objetivos específicos*

- Caracterizar a biomassa de laranja industrial peletizada;
- Avaliar a produção de açúcares redutores totais após diferentes pré-tratamentos (ácido-diluído, ultrassom e autohidrólise) seguidos de hidrólise enzimática no bagaço de laranja industrial peletizado;
- Submeter o bagaço de laranja industrial peletizado, na condição que propicie maior quantidade de açúcar disponível, à fermentação ABE.

#### 4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) da Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba em parceria com o Laboratório de Processos Biológicos (USP- São Carlos). O processo experimental foi dividido em 3 partes: 1) Caracterização do bagaço de laranja peletizado de laranja; 2) Pré-tratamentos do bagaço de laranja peletizado e determinação de açúcares redutores e 3) Ensaio de fermentação ABE com *Clostridium beijerinckii*.

**Figura 9.** Etapa I do desenvolvimento experimental.



##### 4.1 Armazenamento e preparação da biomassa

A biomassa de laranja peletizada foi proveniente da empresa Sucocítrico Cutrale LTDA., localizada no município de Araraquara-SP, a qual cedeu a biomassa de polpa de laranja peletizada com óleo essencial e terpenos cítricos extraídos.

A biomassa de laranja peletizada foi moída e mantida a 110 °C por 72 h para sua total secagem. Depois de seca, a amostra foi novamente moída em moinho tipo Willey MA-340 e então passou por peneiras de 20 mesh (20 ABNT), 35 mesh (40 ABNT) e 60 mesh (60 ABNT) com auxílio do agitador orbital de peneiras com batidas intermitentes. A amostra foi

armazenada em sacos plásticos herméticos em temperatura ambiente (SANTOS et al., 2015; VOLPE et al., 2015).

#### *4.2 Caracterização do bagaço de laranja peletizado*

O bagaço de laranja peletizado foi caracterizado utilizando-se de metodologias já estabelecidas para determinação do teor de umidade e sólidos totais, teor de cinzas, teor de lignina Klason, teor de  $\alpha$ -celulose, teor de holocelulose e teor de hemicelulose. Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Química Geral e Analítica da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba

##### *4.2.1 Determinação de sólidos totais e teor de umidade*

A determinação de sólidos totais e o teor de umidade foram realizados segundo a norma “Determinação de sólidos totais em biomassa e sólidos totais dissolvidos em amostras de processos líquidos” do NREL (*National Renewable Energy Laboratory* - Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos).

Em triplicata, placas de Petri foram previamente lavadas com água destilada e em seguida colocadas em estufa de secagem a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por quatro horas. Após o período de secagem foram transferidas para um dessecador até alcançarem a temperatura ambiente. As placas foram devidamente pesadas em balança analítica (P1).

Foi pesado 0,5g da biomassa já triturada e adicionada nas placas previamente pesadas (P2). As amostras foram levadas à estufa de secagem a temperatura de  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 4 horas e depois mantidas em dessecador até atingirem temperatura ambiente. As placas com a biomassa seca foram pesadas e colocadas na estufa até peso constante (P3). O cálculo foi realizado a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{(P3-P2)}{(P2-P1)} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

P1: Peso da placa seca vazia

P2: Peso na placa com a biomassa

P3: Peso da placa com a biomassa completamente seca

Após o procedimento para sólidos totais o teor de umidade foi calculado a partir da seguinte equação, segundo o protocolo do NREL:

$$\% \text{ Teor de umidade} = \left[ 1 - \frac{(P3-P2)}{(P2-P1)} \right] \times 100 \text{ (equação 2)}$$

P1: Peso da placa seca vazia;

P2: Peso da placa com a biomassa;

P3: Peso da placa com a biomassa completamente seca.

#### 4.2.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado pela norma TAPPI T211 om-93. Foi pesado em triplicata, 1,0 g da amostra seca em cadinhos previamente calcinados a 600 °C, estes foram então colocados em forno mufla a 600 °C durante 3 h. Após o período determinado, os cadinhos foram dispostos em um dessecador até alcançarem temperatura ambiente para então serem pesados.

Após o procedimento o teor de cinzas foi determinado a partir da equação 3:

$$\% \text{ Cinzas} = \left( \frac{m1}{m2} \right) \times 100 \text{ (equação 3)}$$

m<sub>1</sub>: massa (g) de cinzas

m<sub>2</sub>: massa (g) da amostra seca

% Cinzas: teor de cinzas em porcentagem

#### 4.2.3 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel

O teor de lignina Klason insolúvel foi determinado de acordo com o método TAPPI T222 om-02 (2002).

Em triplicata, foi pesado 1,0 g da amostra seca em almofariz e então adicionados 15 mL de ácido sulfúrico (72 % v/v). Macerou-se a mistura delicadamente durante 5 minutos e então foi mantida em repouso pelo período de 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, transferiu-se a mistura para um balão de 1000 mL e o volume foi completado para 560 mL com água deionizada para então este ser mantido em um sistema sob refluxo durante 4 horas.

A mistura foi filtrada à vácuo em um funil de Büchner. A lignina insolúvel retida no filtro foi seca em estufa a 105°C por 4 h para então após alcançar a temperatura ambiente em dessecador, ser pesada. O filtrado restante foi utilizado para a determinação de lignina solúvel.

A porcentagem de lignina Klason insolúvel foi determinada a partir da equação 4:

$$\% \text{ Lignina} = \left( \frac{m1}{m2} \right) \times 100 \text{ (equação 4)}$$

$m_1$ : massa (g) de lignina Klason insolúvel seca

$m_2$ : massa (g) da amostra seca inicial

%Lignina: porcentagem do teor de lignina insolúvel

#### 4.2.4 Determinação do teor de lignina Klason solúvel

O teor de lignina de Klason solúvel foi analisado de acordo com a norma TAPPI T13 m-54 modificada e adaptada por Botaro (1996).

O filtrado obtido na análise do teor de lignina de Klason insolúvel foi diluído em água deionizada até que a concentração de ácido sulfúrico chegasse a 0,05 mol/L e foi analisado em espectroscopia de absorção na região UV-Vis (modelo Genesys 6, Thermo Scientific, USA) nos comprimentos de onda 215 e 285 nm. Foi preparada uma solução referência (branco) de ácido sulfúrico 0,05 mol/L a partir da solução 72 % (v/v).

A concentração de lignina de Klason solúvel foi determinada de acordo com a equação 5, baseada na Lei de Lambert Beer:

$$C_{(g/L)} = \frac{[4,53 \times (A_{215} - A_{280})]}{300} \text{ (equação 5)}$$

$C_{(g/L)}$ : concentração em gramas/litro de lignina de Klason solúvel em amostras diluídas

$A_{215}$ : valor da absorbância em 215 nm

$A_{280}$ : valor da absorbância em 280 nm

A porcentagem de lignina solúvel foi determinada a partir do volume do filtrado e do cálculo de sua concentração, a partir da equação 6:

$$\%Lignina = \left( \frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \text{ (equação 6)}$$

$m_1$ : massa (g) de lignina solúvel a partir do cálculo da concentração

$m_2$ : massa (g) da amostra seca inicial

%Lignina: porcentagem do teor de lignina solúvel

#### 4.2.5 Determinação do teor de alfa-celulose

O teor de  $\alpha$ -celulose foi determinado de acordo com a norma TAPPI T222 om-88. Em triplicata foi pesado 1,0 g de amostra seca e adicionados 10 mL de solução aquosa de NaOH 17,5 %. Após o repouso de 2 min, a mistura foi macerada delicadamente durante 8 minutos. Após este procedimento adicionou-se mais 10 mL da mesma solução e permaneceu em repouso por 20 min. Foram adicionados 40 mL de água deionizada para então a mistura passar por

filtração à vácuo. O resíduo sólido no filtro foi lavado com 200 mL de água deionizada, 20 mL de ácido acético 20% (v/v) e novamente com mais 200 mL de água deionizada. A amostra residual retida no filtro foi então levada à estufa de secagem a 105 °C pelo período de 24 h. Ao término do período as amostras foram mantidas em dessecador até alcançarem temperatura ambiente para serem pesadas. O teor de  $\alpha$ -celulose foi determinado de acordo com a equação 7:

$$\% \alpha - cellulose = \left( \frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \text{ (equação 7)}$$

$m_1$ : massa (g) de  $\alpha$ -celulose seca

$m_2$ : massa (g) de fibras secas

%  $\alpha$ -celulose: porcentagem do teor de  $\alpha$ -celulose.

#### 4.2.6 Determinação do teor de holocelulose

O teor de holocelulose foi determinado de acordo com a norma TAPPI T257 om-85.

Em triplicata, foram adicionados 3,0 g de amostra seca em Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 120 mL de água deionizada, 1,0 mL de ácido acético glacial e 2,5 g de clorito de sódio. Foram devidamente tampados e mantidos sob constante agitação e temperatura de 70 °C durante 3 h, sendo que a cada 1 h foram adicionados 1,0 mL de ácido acético glacial e 2,5 g de clorito de sódio. Resfriaram-se as amostras em banho de gelo até alcançarem temperatura abaixo de 10 °C para então passarem por filtração à vácuo. O resíduo sólido retido no filtro (holocelulose) foi lavado com água deionizada até ficar incolor e a água do filtrado apresentar pH neutro. O resíduo foi mantido em estufa a 105 °C até sua total secagem para então depois ficar em um dessecador até alcançar temperatura ambiente para serem pesados. O percentual de holocelulose foi calculado a partir da equação 8:

$$\% holocelulose = \left( \frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \text{ (equação 8)}$$

$m_1$ : massa (g) de holocelulose seca

$m_2$ : massa (g) de fibras secas

% holocelulose: porcentagem do teor de holocelulose.

#### 4.2.7 Determinação do teor de hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado utilizando-se das porcentagens de holocelulose e  $\alpha$ -celulose previamente determinadas, de acordo com equação 9 (RAZERA, 2006):

$$\% \text{ holocelulose} = \% \alpha - \text{celulose} + \% \text{ de hemicelulose} \text{ (equação 9)}$$

#### 4.2.8 Análise na espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a determinação das fibras e seus tratamentos físico-químicos, a amostra foi analisada em FTIR da Agilent modelo Cary 630 FTIR, equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) e um cristal de diamante. Os espectros foram coletados na faixa de comprimento de onda entre 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com 256 varreduras e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ , esta análise foi realizada em parceria com a Faculdade de Engenharia de Sorocaba - FACENS.

As análises de morfologia das fibras branqueadas e naturais foram realizadas utilizando o MEV. As amostras foram adicionadas em um porta-amostras de alumínio e recobertas com uma fina camada de material condutor e então foram analisadas.

#### 4.3 Determinação da pectina

Em triplicata, 5 g do bagaço foi adicionado em 50 mL de uma solução de 0,05 mol/L de HCl e foi mantido a 100 °C por 1 h. Após 1 h a mistura foi filtrada à vácuo, o filtrado foi reservado e o resíduo retido no papel de filtro foi novamente submetido a etapa anterior. Após o segundo procedimento os dois filtrados foram misturados e resfriados à temperatura ambiente. A pectina foi precipitada adicionando ao filtrado dois volumes de uma solução de 95 % de etanol acidificada com 0,05 mol/L de HCl (SUDHAKAR e MAINI, 1999).

A pectina resultante foi filtrada em papel de filtro previamente pesado e lavada com uma solução de 65 % etanol acidificada. O papel de filtro com a pectina foi mantido em estufa a 40 °C até peso constante. O teor de pectina foi determinado de acordo equação 10:

$$\% \text{ pectina} = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \times 100 \text{ (equação 10)}$$

$m_1$ : massa do papel filtro

$m_2$ : massa do papel filtro com a pectina seca

$m_3$ : massa do bagaço de laranja

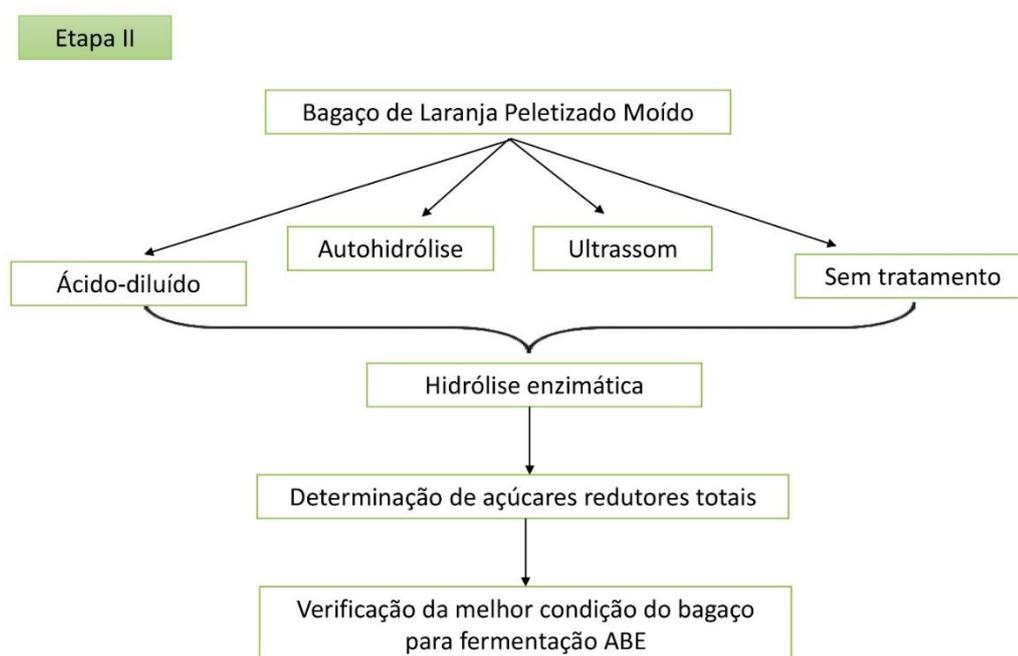
#### 4.4 Determinação do poder calorífico superior

A determinação foi realizada em bomba calorimétrica IKA modelo C200 no Laboratório de Biomassa e Bioenergia da UFSCar-Sorocaba (NAKASHIMA et al., 2016).

#### 4.5 Determinação do teor de proteína

Foi determinado o teor de proteína do bagaço de laranja peletizado usando a metodologia proposta por Kjeldahl (1833). O método quantifica o nitrogênio orgânico total presente na amostra, como em alimentos o nitrogênio não proteico é muito pouco, portanto a determinação do teor de nitrogênio proteico foi realizada usando o fator de conversão.

**Figura 10.** Etapa II do desenvolvimento experimental.



#### 4.6 Processos de pré-tratamentos

##### 4.6.1 Autohidrólise

Para a autohidrólise, a biomassa seca foi misturada com água na proporção sólido-líquido de 1:10 (50 g da biomassa seca foi adicionada em um béquer contendo 500 mL de água) por 15 min. Após homogeneização, a mistura foi aquecida a 180 °C sob 1 atm por 60 min e ao término, foi resfriado imediatamente (LEE et al., 2009; AMIRI; KARIMI, 2015).

##### 4.6.2 Ácido-diluído

O pré-tratamento ácido-diluído foi realizado com 1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na proporção sólido-líquido de 1:10 (g/mL), e ficou durante 40 min em autoclave a 130 °C sob 1 atm. Após filtração, o resíduo sólido foi lavado com água destilada de modo a remover o ácido (LI et al., 2017; MAITI et al., 2018).

#### 4.6.3 Ultrassom

Em um béquer 10 g do bagaço foram adicionados 200 mL de água destilada e este frasco foi acomodado no interior do banho ultrassom modelo USC-1600A na frequência de 40kHz durante 50 min, sendo que na metade do tempo o líquido recebeu agitação mecânica (SUN et al., 2004).

#### 4.7 Hidrólise enzimática

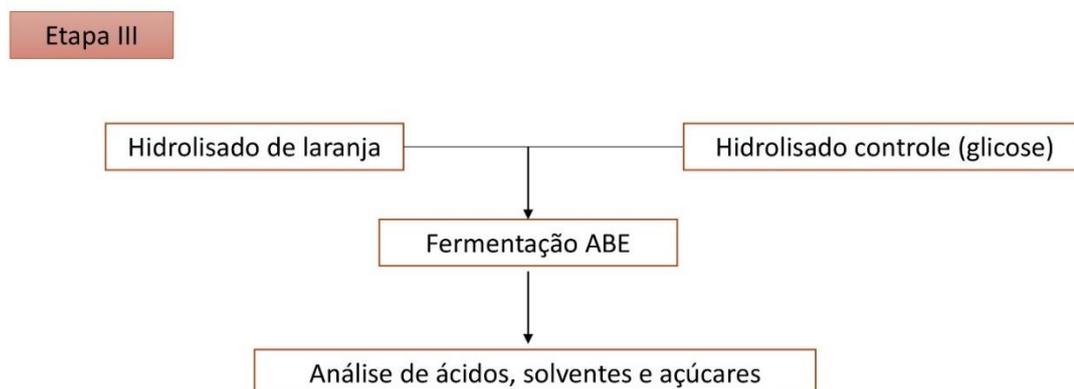
Para hidrólise enzimática foi utilizado um complexo enzimático celulolítico (arabanase, celulase,  $\beta$ -glucanase, hemicelulase e xilanase) Viscozyme® L da Novozyme Corp, obtido a partir do fungo *Aspergillus* sp., com atividade enzimática de 100FBG/g. Esta foi realizada utilizando 20 FBG/g.

Suspensões contendo 5% da biomassa sólida com e sem pré-tratamento foram preparadas, autoclavadas a 121°C por 20 min para então serem suplementadas com as soluções enzimáticas e uma solução tampão de citrato de sódio (50 mM e pH 4,8). A hidrólise enzimática ocorreu a 45 °C com agitação constante de 140 rpm por 72 h no bagaço de laranja peletizado após cada pré-tratamento e no bagaço não tratado (AMIRI; KARIMI; ZILOUEI, 2014).

A cada 12 h foram retiradas alíquotas de 1 mL, estas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min e então o hidrolisado (sobrenadante) foi analisado quanto a concentração de açúcares redutores totais pelo método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

#### 4.8 Determinação de açúcares redutores totais

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método colorimétrico ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Uma curva padrão foi feita com diversas concentrações de glicose. Para cada 1 mL da amostra a ser analisada foi adicionado 1 mL do reagente DNS e então mantido durante 10 min em água fervente. Após o período determinado, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e então 8 mL de água destilada foram adicionados. As amostras foram agitadas e posteriormente leu-se a absorbância a 640 nm. Para o branco utilizou-se uma solução tampão padrão.

**Figura 11.** Etapa III do desenvolvimento experimental.

#### 4.9 Preparo do inóculo

A cepa de *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) foi obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, e utilizada como inóculo em todos os ensaios de fermentação (triplicata).

A cepa foi mantida em glicerol a  $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes de ser utilizada foi submetida a choque térmico à  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min seguido de arrefecimento em água gelada até atingir temperatura ambiente. Esta suspensão foi transferida para o meio estéril de Tryptone-yeast extract-acetate (TGY) em condições anaeróbias (*headspace* de  $\text{N}_2$ ) e ficou incubada durante 16-18h à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O inóculo foi padronizado por densidade óptica de 1,2-1,6 em espectrofotômetro a 610 nm (QURESHI et al., 2008; LIGUORI et al., 2016).

#### 4.10 Fermentação acetona-butanol-etanol

A fermentação ABE ocorreu com a condição que obteve maiores concentrações de ART e o controle foi realizado usando glicose como substrato.

Em frascos reagentes de 250 mL foram adicionados 50 mL do hidrolisado, 0,05 g de extrato de levedura e o pH será ajustado para 6,5 (NaOH 5M) e então autoclavados a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Ao atingir temperatura ambiente, foi adicionado 0,5 mL de uma solução estoque estéril composta por: tampão (50 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 50 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 220 g/L  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ); vitamina (0,1 g/L ácido para-amino-benzóico; 0,1 g/L tiamina; 0,001 g/L biotina) e mineral (20 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g/L NaCl) (MORADI et al., 2013; AMIRI; KARIMI; ZILOUEI, 2014).

Nitrogênio ( $\text{N}_2$ , 100%) foi usado para trocar a atmosfera dos reatores anaeróbios. Os frascos foram inoculados com 6 mL da suspensão do microrganismo padronizada. A fermentação ocorreu em 120 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob constante agitação de 160 rpm. Alíquotas foram

retiradas assepticamente com agulhas e seringas estéreis a cada 12 h até o final da fermentação e então centrifugadas a 9000 rpm por 25 min (AMIRI; KARIMI, 2013, 2015; MORADI et al., 2013; JAFARI; AMIRI; KARIMI, 2016). Os sobrenadantes foram analisados quanto a concentração de açúcares redutores totais, solventes e ácidos orgânicos.

#### *4.11 Análise de produtos da fermentação*

A determinação de butanol, etanol, acetona, ácido acético e ácido butírico foi realizada por cromatografia gasosa (cromatógrafo - Shimadazu CG-2010) com detector de ionização de chama (FID), com coluna HP INNOWAX conforme metodologia de Adorno; Hirasawa; Varesche (2014). Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP).

#### *4.12 Análise estatística*

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e foram feitas suas médias e desvios padrão. O teste de variância Anova foi aplicado e quando este apresentou diferença significativa entre amostras, foi utilizado o teste Tukey com nível de significância de 5 % aos pares. Todos os cálculos foram realizados utilizando o Excel.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da biomassa

O bagaço de laranja peletizado analisado apresentou baixo teor de lignina ( $6,16 \pm 0,47$  %) indicando que este resíduo pode ser mais facilmente hidrolisado quando comparado a outros tais como: bagaço de cana-de-açúcar (15-20 % de lignina); palha de aveia (10-15 % de lignina); palha de trigo (12-16 % de lignina); casca de arroz (15,4-20 % de lignina). A lignina em grande quantidade impossibilita o acesso aos polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais, portanto, baixos teores de lignina diminuem a recalcitrância da parede celular vegetal (ISIKGOR; BECER, 2015).

O teor de holocelulose ( $\alpha$ -celulose + hemicelulose) foi de aproximadamente 19 % (Tabela 5) o que indica os carboidratos após remoção da lignina e de proteína de 3,14 %. Dados estes corroboram com a literatura, pois a polpa cítrica é energética e possui um baixo teor de proteína, fato este que apesar de em sua forma peletizada, o bagaço de polpa cítrica ser utilizado na alimentação animal, seu baixo teor de proteína não supre as necessidades nutricionais dos animais, precisando ser suplementada (GROHMAN et al., 1995; PEDROSO; CARVALHO, 2006; TAHERZADEH et al., 2010). As frutas cítricas não são uma boa fonte de proteínas, sendo o conteúdo proteico encontrado em limões de 0,06%, 0,08% em tangerinas e de 0,08-0,11% em laranjas (CLEMENTS; LELAND, 1962; LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012).

**Tabela 5.** Caracterização do bagaço de laranja peletizado.

Composição	(%)
Cinzas	$3,87 \pm 0,11$
Umidade	$1,71 \pm 0,54$
$\alpha$ -celulose	$5,37 \pm 0,62$
Lignina	$6,16 \pm 0,47$
Holocelulose	$18,99 \pm 0,21$
Hemicelulose	$13,62 \pm 0,66$
Proteína	$3,14 \pm 0,01$
Pectina	$7,21 \pm 2,10$

Baixos teores de cinzas são comuns em biomassas provenientes de resíduos agrícolas, porém, durante o processo de peletização do bagaço, é necessário a adição de hidróxido de sódio ou de cálcio para facilitar o desprendimento máximo de água, o que eleva os níveis de

cálcio ou sódio na amostra (VASSILEV et al., 2010). Desse modo, os valores do teor de cinzas podem variar muito dependendo da quantidade de hidróxido de sódio ou de cálcio que foram utilizados no processo, pois aumentam a quantidade de matéria inorgânica na amostra. Além disso, para poder ser peletizado o bagaço precisa conter no mínimo de 88-90 % de massa seca, e antes deste processo, nesta biomassa, todos os extrativos foram retirados, o que corrobora com o baixíssimo teor de umidade obtido neste trabalho (1,71 %  $\pm$  0,54). Tal valor é totalmente diferente para o bagaço de laranja *in natura* que apresenta um alto teor de umidade chegando perto de 80 % (MACEDO et al., 2007; CAVICHIOLO et al., 2010).

Neste trabalho o teor de pectina foi de 7,21 %. A pectina do bagaço de laranja *in natura* é em torno de 25-30 %, porém esta é muito utilizada na indústria, sendo retirada para a utilização como espessante na indústria alimentícia e por ser solúvel em água, também faz parte da composição do suco (RIVAS et al., 2008; CANTERI et al., 2012).

A Tabela 6 apresenta a caracterização química do bagaço de laranja peletizado em alguns trabalhos.

**Tabela 6.** Composição do bagaço de laranja peletizado.

Proteína (%)	FDN (%)	FDA(%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Fonte
6,86	23,09	18,47	-	-	(AMORIM et al., 2013)
6,00	25,07	24,00	-	-	(PEREIRA et al., 1999)
6,90	24,20	22,2	0,9	7,2	(NRC, 2001)
6,88	27,80	12,31	3,75	-	(RODRIGUES et al., 2007)
8,10	25,10	-	-	6,2	(O'MARA et al., 1999)
3,14	25,15	11,53	6,16	3,87	Presente estudo

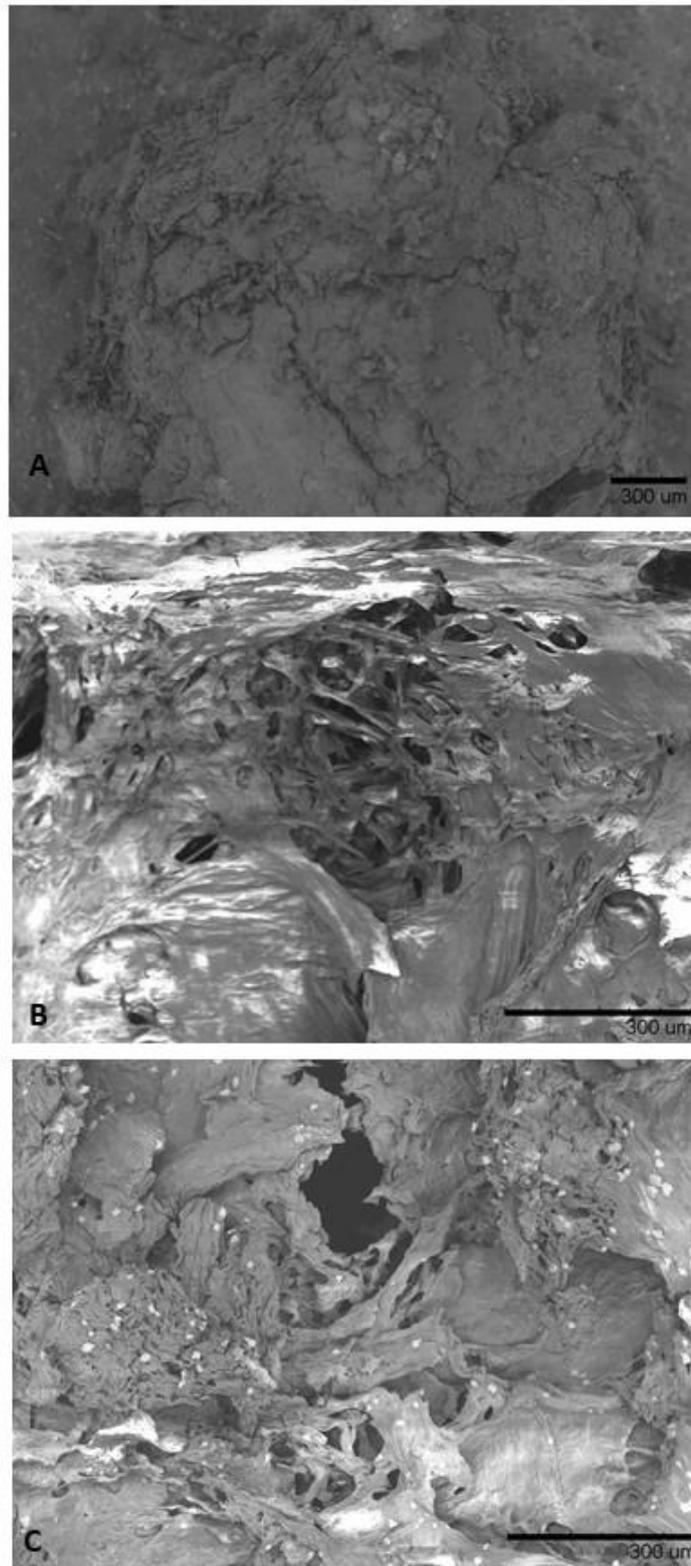
FDN: fibra em detergente neutro - celulose, hemicelulose e lignina.

FDA: fibra detergente ácido – celulose e lignina.

Comparando a caracterização do bagaço utilizado no presente trabalho com dados da literatura observou-se diferenças entre os valores que pode ser consequência dos diferentes cultivares de laranja, solos em que foram cultivadas, parâmetros geográficos e climáticos, bem como danos mecânicos e ataques de pragas podem influenciar na concentração e assimilação de nutrientes nos vegetais, fazendo com que a composição química e o valor nutritivo variem consideravelmente. Em frutas, até mesmo a maneira como foi processada na indústria pode influenciar na composição química, bem como as formas de desidratação e extração ou não de óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2005).

As micrografias obtidas através de MEV do bagaço de laranja peletizado bruto e branqueado ( $\alpha$  e holocelulose) estão representadas na Figura 12.

**Figura 12.** Micrografia por MEV do bagaço de laranja peletizado (A) Bagaço bruto (B) Bagaço método holocelulose (C) Bagaço método  $\alpha$ -celulose.



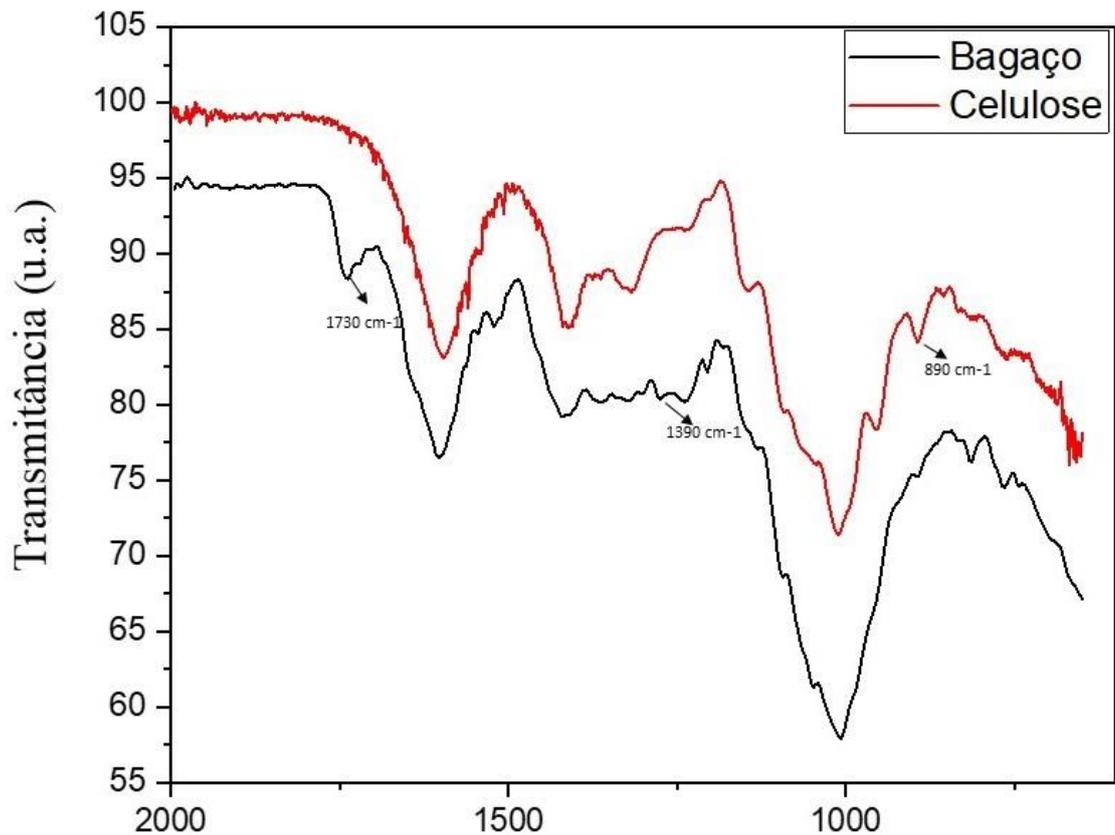
Na Figura 12 (A) o bagaço de laranja bruto encontra-se totalmente agregado, sem distinção de fibras e bem homogêneo. No branqueamento realizado (Figura 12-B), que corresponde à metodologia para determinar o teor de holocelulose, é possível observar que a

reação com o clorito de sódio em meio ácido e a consequente liberação de dióxido de cloro em meio reacional, promoveu a oxidação da lignina, pois a micrografia demonstra as fibras bem expostas, não muito agregadas, representando a deslignificação da fibra (SIQUEIRA, 2008).

Na Figura 12 (C) que representa o branqueamento referente à metodologia de  $\alpha$ -celulose, a utilização de NaOH provoca a degradação de ésteres e das cadeias glicosídicas, alterando a estrutura da lignina e diminuição da cristalinidade da celulose, a micrografia também apresenta as fibras mais expostas (AZEVEDO, 2012).

Por meio da análise de FTIR foi possível verificar quimicamente o bagaço peletizado bruto e a sua extração de celulose (Figura 13). Na Tabela 7 encontram-se os valores das bandas correspondentes, características de celulose, hemicelulose e lignina.

**Figura 13.** Espectro de FTIR do bagaço de laranja peletizado antes e após branqueamento.



**Tabela 7.** Bandas características observadas em espectros de FTIR.

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> ) – regiões de banda	Atribuição da banda	Referência
1730-1738	Vibrações de valência de C=O. $\gamma$ de cetonas não conjugadas, grupos carboxilas: lignina, xilano (hemicelulose)	Vallejos et al. (2011); Terpakova et al. (2012); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)
1370-1380	$\delta$ CH: celulose, hemicelulose e lignina e $\delta$ OH fenólico: lignina	Vallejos et al. (2011); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)
892-899	$\gamma$ Ligações $\beta$ -glicosídicas e $\gamma$ CCH: celulose	Terpakova et al. (2012); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)

A partir do espectro gerado e da análise dos dados contidos na Tabela 7 foi possível observar que na amostra bruta encontra-se a banda 1390 cm<sup>-1</sup>, característica da ligação OH fenólico presente na lignina, sendo esta não encontrada na amostra branqueada (celulose). No espectro do bagaço bruto ainda é possível observar a presença da banda 1730 cm<sup>-1</sup> que é característica da ligação C=O presente na hemicelulose e lignina. Já no espectro da celulose a presença da banda 890 cm<sup>-1</sup> confirma a remoção de parte da lignina, pois esta representa uma ligação glicosídica, característica de região amorfa da celulose.

O espectro confirmou que a determinação das fibras (%) está bem representativa, estando as amostras de holo e  $\alpha$ -celulose bem isoladas e sem maior interferência de algum outro resíduo.

### 5.2 Poder calorífico superior

O poder calorífico superior do bagaço de laranja peletizado foi de 17191,5 J/g, valor dentro da faixa (de 17000 a 20000 J/g) de muitas biomassas que incluem os resíduos agrícolas como: farelo de trigo (17370 J/g); palha de cevada (17369 J/g); casca de coco (18875 J/g); casca de limão (17184 J/g); casca de laranja (16724 J/g); casca de arroz (15899 J/g). Em comparação, o carvão mineral, considerado um bom combustível sólido, possui 29712 J/g (GARCÍA et al., 2012).

O processo de peletização, assim como o processo de briquetagem, são processos que compactam a biomassa de modo a garantir uniformidade de tamanho e formato dos produtos, facilitando seu armazenamento bem como agregar valor à biomassa residual e por deixá-la mais densa aumentam sua concentração energética por volume. Sendo assim, esses procedimentos podem gerar biocombustíveis sólidos de alta qualidade, a Europa e Estados Unidos são consumidores potenciais de peletes, uma vez que esses podem ser utilizados no aquecimento

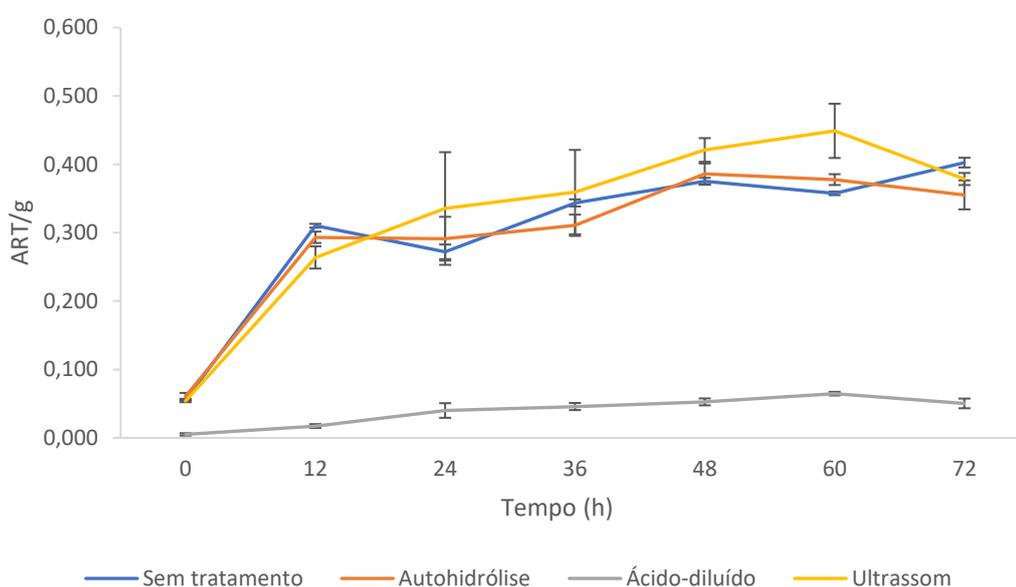
de ambientes. Peletes ou briquetes podem ser feitos a partir de diversas biomassas, seja ela de origem florestal, madeireira, agrícola, cavaco etc. (EMBRAPA, 2012).

Alto teor de umidade e um alto teor de cinzas estão relacionados na redução do poder calorífico dos materiais. Grande quantidade de matéria inorgânica na biomassa como minerais alcalinos podem diminuir a eficiência de caldeiras por permanecerem como resíduo. E diferentemente dos processos fermentativos, os extrativos e o teor de lignina ajudam no poder calorífico das biomassas (NAKASHIMA et al., 2016).

### 5.3 Pré-tratamentos seguidos de hidrólise enzimática no bagaço de laranja peletizado

A Figura 14 apresenta a quantidade de açúcares em gART/g (grama de açúcares redutores totais por grama de bagaço) após 72 h de hidrólise enzimática do bagaço submetido aos diferentes pré-tratamentos realizados.

**Figura 14.** Concentração de ART/g do bagaço após hidrólise enzimática dos diferentes pré-tratamentos.



Pode-se observar que o bagaço sem pré-tratamento e submetido à autohidrólise e ultrassom obtiveram valores muito próximos entre si de concentração de gART/g ao final da hidrólise enzimática, sendo 0,355 gART/g, 0,379 gART/g e 0,402 gART/g respectivamente. Para o bagaço com o pré-tratamento ácido-diluído seguido de hidrólise enzimática apresentou a menor concentração de ART (0,050 gART/g). Teste de variância (ANOVA) foi realizado de

modo a verificar se de fato existe ou não diferença significativa entre os pré-tratamentos com o bagaço sem tratamento (Tabela 8).

**Tabela 8.** Interações entre as condições em que foram submetidas o bagaço de laranja peletizado seguido de hidrólise enzimática.

Fonte da variação	<i>F</i>	valor- <i>P</i>	<i>F</i> crítico
Bagaço com e sem pré-tratamentos	35,78608	9,06E-15	2,718785

nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

A interação dos valores obtidos de gART/g do bagaço de laranja peletizado sem pré-tratamento e com os pré-tratamentos apresentou diferenças significativas, apresentando um valor  $p$  de  $9,06 \times 10^{-15}$  sendo inferior ao erro ( $p < 0,05$ ), indicando que houve variação na quantidade de açúcares redutores obtida após as 72 h de hidrólise enzimática.

Para avaliar e identificar a fonte desta variação foi realizado o teste- $t$  (Tukey) com significância de 5 % e seus resultados estão compilados nas tabelas 9 e 10.

**Tabela 9.** Valores médios em gramas de ART por grama de bagaço de todas as condições em que foi submetido o bagaço de laranja peletizado.

Sem pré-tratamento	Autohidrólise	Ácido-diluído	Ultrassom
0,302a	0,296a	0,039b	0,316a

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si.

**Tabela 10.** Valores de  $p$  uni-caudal para a interação entre os tratamentos

Pré-tratamentos	Sem tratamento	Autohidrólise	Ultrassom
Sem tratamento	-	-	-
Autohidrólise	0,4308	-	-
Ultrassom	0,2122	0,1660	-
Ácido-diluído	$4,6023 \times 10^{-10}$	$1,4685 \times 10^{-10}$	$1,825 \times 10^{-9}$

nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )

A partir do teste- $t$  foi possível verificar que o pré-tratamento ácido-diluído apresentou uma diferença significativa entre os demais pré-tratamentos e com o bagaço não tratado. Dentre

todas as condições as quais foram submetidas o bagaço, o pré-tratamento ácido obteve a menor quantidade de açúcares redutores, sendo esta quantidade significativamente menor. Todos os valores de  $P(T \leq t)$  uni-caudal do bagaço pré-tratado com ácido-diluído, quando comparado com os demais, foram muito menores do que o nível de significância de 0,05 % indicando variação. Para os pré-tratamentos de autohidrólise e ultrassom juntamente com o bagaço sem tratamento apresentaram valores de  $P(T \leq t)$  uni-caudal superiores ao erro, indicando que não houve variação na quantidade de açúcares redutores disponível após a hidrólise enzimática entre eles.

Sendo assim, apenas o bagaço de laranja sem tratamento químico e com hidrólise enzimática foi selecionado para a fermentação ABE utilizando *C. beijerinckii* e sua fermentação foi comparada à fermentação controle utilizando glicose como substrato.

Amiri e Karimi (2015) utilizaram o pré-tratamento de autohidrólise em madeiras de pinheiro e olmo e obtiveram maior concentração de açúcares após hidrólise enzimática do que seu controle sem pré-tratamento. A autohidrólise seguida de hidrólise enzimática resultou numa concentração de açúcar de 3 a 8 vezes maior do que a obtida sem pré-tratamento, sendo 10,0 g/L em pinheiro pré-tratado e 23,2 g/L em olmo pré-tratado.

Bellido et al. (2015) testaram a produção de acetona-butanol-etanol usando como fonte de carbono a polpa de beterraba. O pré-tratamento de autohidrólise seguido de hidrólise enzimática não apresentou diferenças significativas com a polpa bruta. A autohidrólise seguida de hidrólise enzimática só apresentou boas concentrações de açúcares fermentáveis em pH 4,0 após adição de ácido sulfúrico concentrado (96% v/v).

A hidrólise ácida apesar de apresentar alta eficiência em hidrolisar a hemicelulose e a celulose em altas temperaturas, sua principal desvantagem está na degradação de açúcares e na formação de alguns subprodutos indesejáveis durante a reação de hidrólise que são inibidores enzimáticos desfavorecendo a hidrólise enzimática como o furfural, hidroximetilfurfural, fenol e formaldeído (TAHERZADEH; KARINI, 2007 ; RIBEIRO et al., 2012) .

Lu et al. (2007) utilizaram o pré-tratamento de ácido-diluído em palha de milho e o melhor resultado obtido para hidrólise enzimática foi utilizando  $H_2SO_4$  na concentração de 2 % a 120 °C durante 43 minutos, onde 77 % da xilose foi alcançada, porém glicose foi de apenas 8,4 %. Outras concentrações de ácido obtiveram maiores valores de glicose, mas pelo fato de conterem maiores subprodutos indesejáveis oriundos da degradação da hemicelulose e xilanas, a hidrólise enzimática não foi eficiente.

Provavelmente o rendimento de glicose na hidrólise ácida é baixo devido à recalitrância da celulose, desta maneira, alguns trabalhos optam por modificar a estrutura da

celulose para otimizar este pré-tratamento, tornando-a menos cristalina ou promovendo uma desintegração prévia, porém em biomassas ricas em amido, o rendimento de glicose após este tipo de pré-tratamento pode chegar a 100 %, já que o amido é um polímero amorfo constituído de ligações de  $\alpha$ -glicose (AMIRI; KARIMI, 2013).

Li et al. (2017) ao realizarem hidrólise ácido-diluído na concentração de 1 % de  $H_2SO_4$  a 140 °C por 1h em bagaço de cana-de-açúcar obtiveram, uma quantidade mesmo que baixa de inibidores, tais como ácido acético (4,79 g/L), furfural (1,68 g/L) e 5-hidroximetilfurfural (0,17 g/L) e residual de lignina que inviabilizaram a hidrólise enzimática, ao passo que quando realizado o mesmo pré-tratamento acrescido de aminólise oxidativa, este oxidou o excedente de lignina e promoveu uma maior solubilidade para xilanos, impedindo a formação de inibidores.

Para o pré-tratamento de ultrassom Wang et al. (2007) avaliaram sua influência em uma celulose microcristalina, e após 20 min de exposição à 20 kHz, a celulose apresentou menor grau de cristalinidade pois o ultrassom destruiu suas ligações de hidrogênio e promoveu uma maior área superficial. Li et al. (2005) ao utilizarem ultrassom a 120 W como pré-tratamento notaram que o mesmo promoveu um aumento da recalcitrância em papéis com impurezas de lignina, pois houve um amolecimento da lignina e esta difundiu-se sobre as microfibrilas de celulose, dificultando a hidrólise enzimática.

Sun e Tomkinson (2002) conseguiram um rendimento 1,5 % maior de extração de hemicelulose submetendo ultrassom na palha de trigo em meio alcalino, no entanto Velmuruga e Muthukumar (2011) quando submeteram bagaço de cana-de-açúcar ao ultrassom utilizando 2 % de NaOH a 50 °C obtiveram mais de 70% de remoção da lignina e 20 % de hemicelulose.

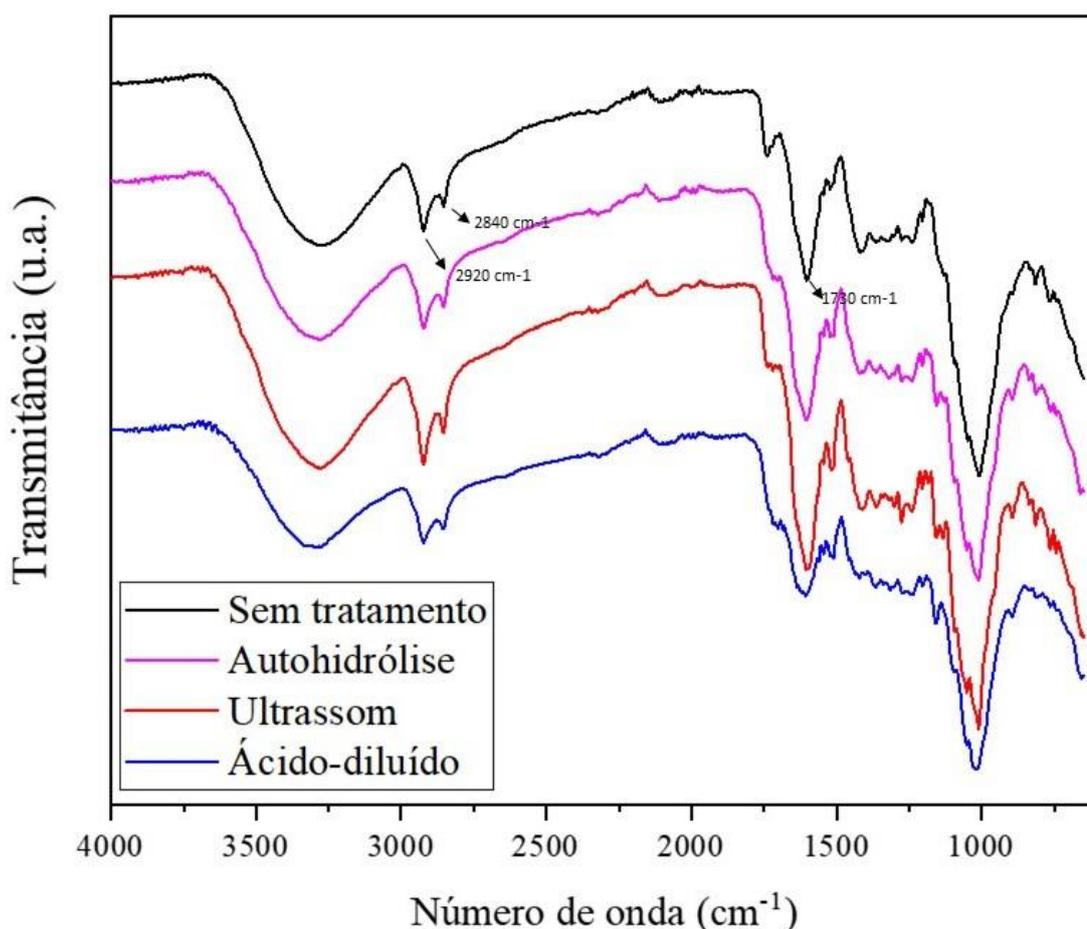
Rodrigues e Pinto (2007) ao submeterem cascas de coco moídas ao ultrassom, verificaram que tal tratamento promoveu a remoção de compostos fenólicos da amostra. Yu et al. (2009) não observaram nenhuma mudança significativa na composição química da casca de arroz após o pré-tratamento de ultrassom, apenas a hidrólise enzimática mostrou-se mais eficiente.

Em celulose microcristalina o pré-tratamento de ultrassom apresenta eficiência, enquanto que quando utilizado para o tratamento de biomassa lignocelulósica, devido a uma maior recalcitrância do material, este pré-tratamento só apresenta maiores rendimentos de açúcares fermentáveis e remoção da lignina quando realizado simultaneamente à outro, seja ele, ácido ou alcalino, e como cada biomassa apresenta características únicas, suas concentrações e tempos de exposição devem ser testados (GARCÍA et al., 2011; RAMADOSS; MUTHUKUMAR, 2014; WU et al., 2017).

No presente trabalho, como a concentração de açúcares redutores totais após a hidrólise enzimática foi realizada pelo método DNS não foi possível determinar e quantificar quais os açúcares obtidos, nem a presença de inibidores. Como a hidrólise ácido-diluído foi desfavorável no bagaço de laranja peletizado quando comparado às demais condições, há a possibilidade de ter gerado subprodutos indesejáveis à hidrólise enzimática, não obtendo açúcares em maiores quantidades. Na autohidrólise e o ultrassom, a recalcitrância da parede celular da biomassa em estudo pode ter dificultado um melhor desempenho e por ter baixo teor de lignina seus resultados foram significativamente próximos aos do bagaço sem tratamento.

Para verificar se ocorreram alterações nas ligações químicas do bagaço após os pré-tratamentos, foi realizada a análise de FTIR (Figura 15).

**Figura 15.** Espectros de FTIR do bagaço de laranja peletizado após pré-tratamentos.



A partir do espectro foi possível observar que a estrutura química do bagaço se manteve após todos os pré-tratamentos realizados, bandas características (Tabela 11) de hemicelulose, triglicerídeos, ésteres, ácidos graxos, ácidos orgânicos e esteróis são observadas em todas as

condições do bagaço de laranja peletizado. A presença da banda  $1730\text{cm}^{-1}$  característica da ligação C=O presente na hemicelulose e lignina em todos os espectros indica que nenhum pré-tratamento obteve a remoção total da lignina.

De modo geral, observou-se o mesmo perfil nos espectros apresentados, indicando que os pré-tratamentos não promoveram mudanças na estrutura do bagaço de modo a diminuir a recalitrância da parede celular. Quanto ao pré-tratamento ácido-diluído, apesar de apresentar concentração açúcares redutores inferior aos demais após hidrólise enzimática, seu espectro com algumas bandas menos intensas, porém com o perfil semelhante aos demais. Provavelmente essa hidrólise não promoveu nenhuma modificação na estrutura do material e seu menor rendimento pode estar realmente relacionado à formação de inibidores enzimáticos.

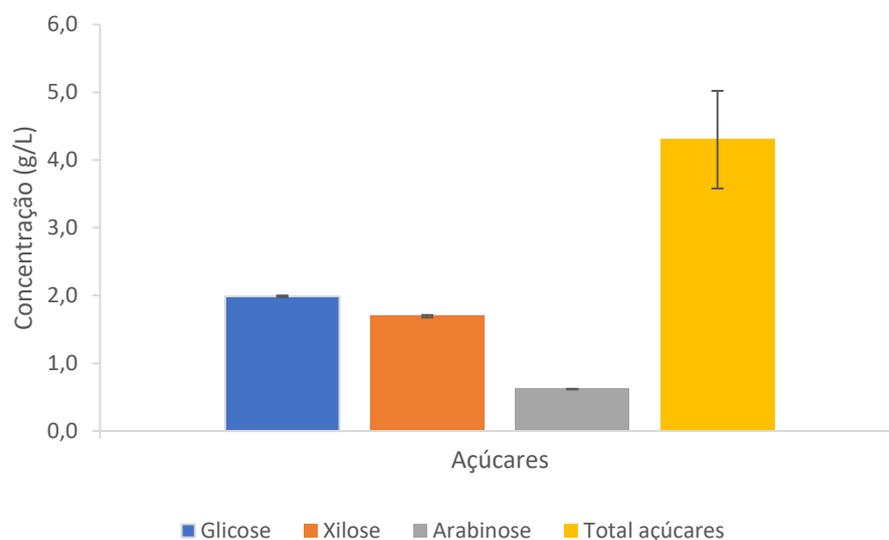
**Tabela 11.** Bandas características observadas em espectros de FTIR.

Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) – regiões de banda	Atribuição da banda	Referência
2917-2920	$\gamma$ C-H: celulose, triglicerídeos, hemicelulose.	Terpacova et al. (2012)
2840-2850	$\gamma$ CH <sub>2</sub> assimétrico e simétrico: polissacarídeos, hemicelulose.	Schwanninger et al. (2004); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)
1730-1738	Vibrações de valência de C=O. $\gamma$ de cetonas não conjugadas, grupos carboxilas: lignina, xilano (hemicelulose)	Vallejos et al. (2011); Terpakova et al. (2012); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)
1370-1380	$\delta$ CH: celulose, hemicelulose e lignina e $\delta$ OH fenólico: lignina	Vallejos et al. (2011); Abidi; Cabrales; Haigler (2014)

#### 5.4 Fermentação acetona-butanol-etanol

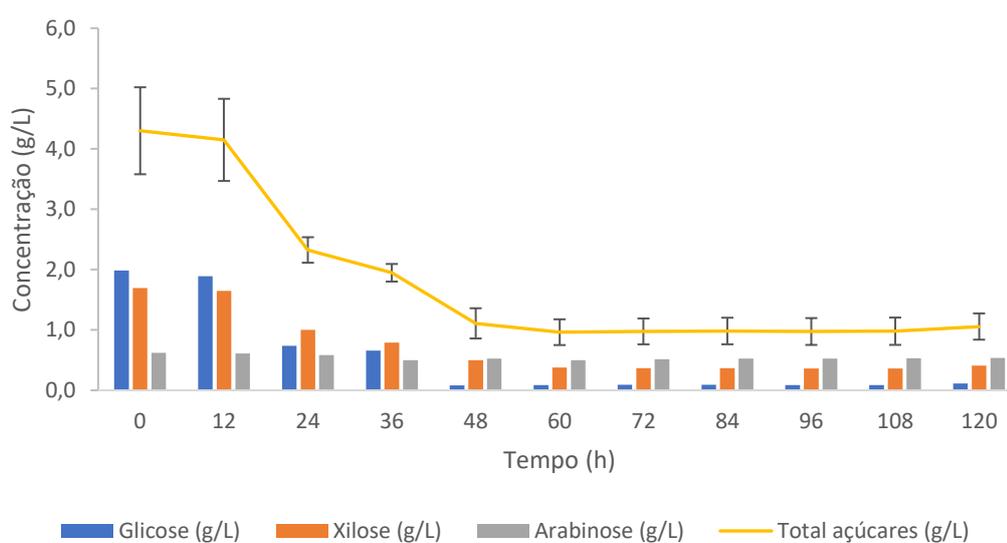
O hidrolisado do bagaço de laranja após hidrólise enzimática foi usado na fermentação ABE, sendo seus açúcares: glicose (9,15 %), xilose (7,79 %) e arabinose (2,84 %), totalizando 19,78 % de açúcares (Figura 16).

**Figura 16.** Açúcares obtidos após hidrólise enzimática do bagaço de laranja peletizado.



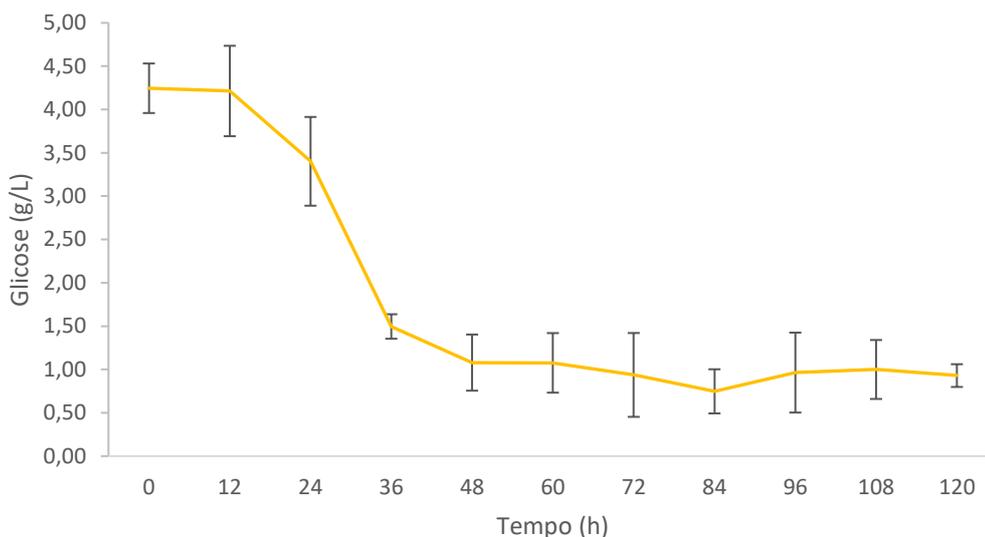
A concentração inicial de açúcares na fermentação do hidrolisado de laranja (Figura 17) foi de 4,301 g/L, sendo: 1,988 g/L de glicose; 1,694 g/L de xilose e 0,619 g/L de arabinose, e no final da fermentação houve consumo de 75 % dos açúcares sendo: 43,61 % de glicose; 29,89 % de xilose e 1,92 % de arabinose, restando ao final das 120 h as seguintes concentrações: 0,112 g/L de glicose; 0,408 g/L de xilose e 0,536 g/L de arabinose.

**Figura 17.** Consumo de açúcares por *C. beijerinckii* na fermentação ABE do hidrolisado de laranja peletizada como substrato.



Na fermentação controle (glicose) a concentração inicial de glicose foi de 4,254 g/L e a concentração final de 0,929 g/L (Figura 18), apresentando um consumo maior do que o hidrolisado (78%).

**Figura 18.** Consumo de glicose por *C. beijerinckii* ao longo da fermentação ABE controle com glicose como substrato



O consumo de açúcar por *Clostridium beijerinckii* foi maior para o controle (78,11 %) do que no hidrolisado (75,42 %). No hidrolisado de laranja os açúcares disponíveis foram pentose e hexoses e o seu menor consumo e rendimento pode ser explicado pela presença das pentoses, as quais são menos assimiladas do que a glicose devido a preferência por esta fonte de carbono (HELUANE et al., 2011; XUE et al., 2017).

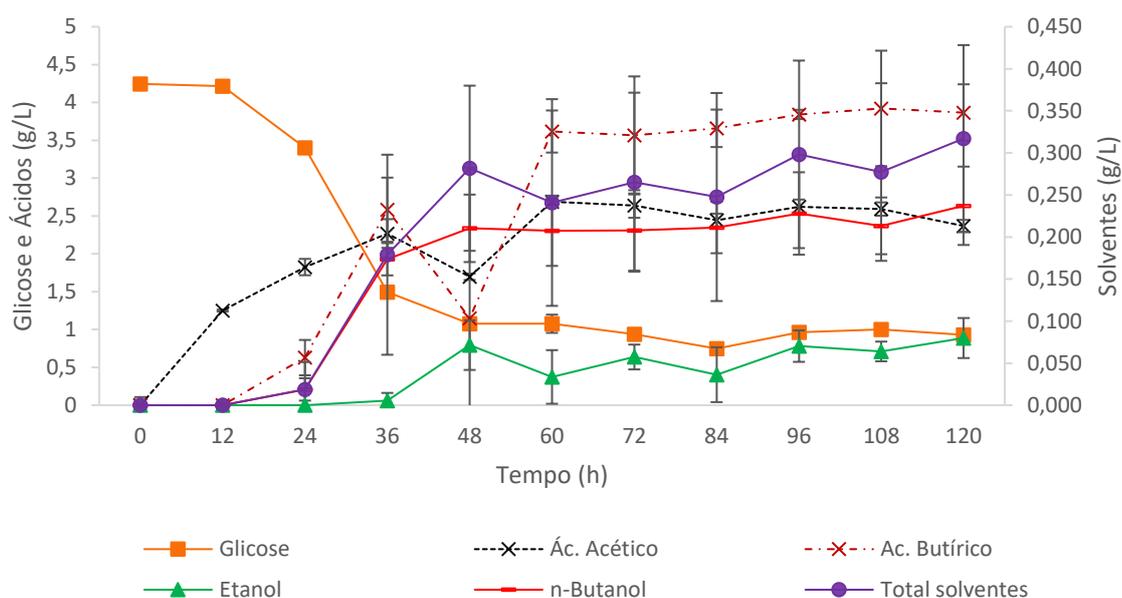
Em clostrídios há estudos sobre a repressão por metabólito de carbono (CCR) regulada pela proteína CcpA, que quando em meio contendo substratos favoritos como a glicose, suprime a utilização dos demais. Sabe-se que dentre as cepas solventogênicas mais utilizadas, *C. beijerinckii* é mais eficiente que *C. acetobutylicum* na assimilação de fontes de carbono mais complexas (MITCHELL; ALBASHERI; YAZDANIAN, 1995). Cepas modificadas podem não apresentar esta característica ou tê-la menos expressa em seus genes. Heluane et al. (2011) com a cepa *C. beijerinckii* SA-1 em meio contendo xilose e glicose observaram capacidade de co-metabolizar os dois substratos, e no trabalho de Gu et al. (2009) uma transaldolase (enzima não oxidativa da via das pentoses fosfato) de *E. coli* foi expressa em uma cepa de *C. acetobutylicum* para aumentar o consumo de D-xilose, esse mecanismo não conseguiu cessar a repressão CCR mas a assimilação de D-xilose pela cepa foi maior que a cepa controle.

Li et al. (2017) utilizaram cana-de-açúcar como substrato na fermentação ABE e o consumo de xilose e glicose por *Clostridium acetobutylicum* não ocorreu simultaneamente, após 120 h de fermentação o resíduo de xilose foi 25 % maior do que de glicose confirmando que a glicose inibiu a utilização de xilose.

Grimmler et al. (2010) avaliaram o crescimento de *C. acetobutylicum* em meio com xilose e glicose e a assimilação da glicose foi mais rápida e somente após seu consumo, passou a assimilar xilose, porém a taxa de crescimento com esta fonte de carbono foi muito menor quando comparada à glicose.

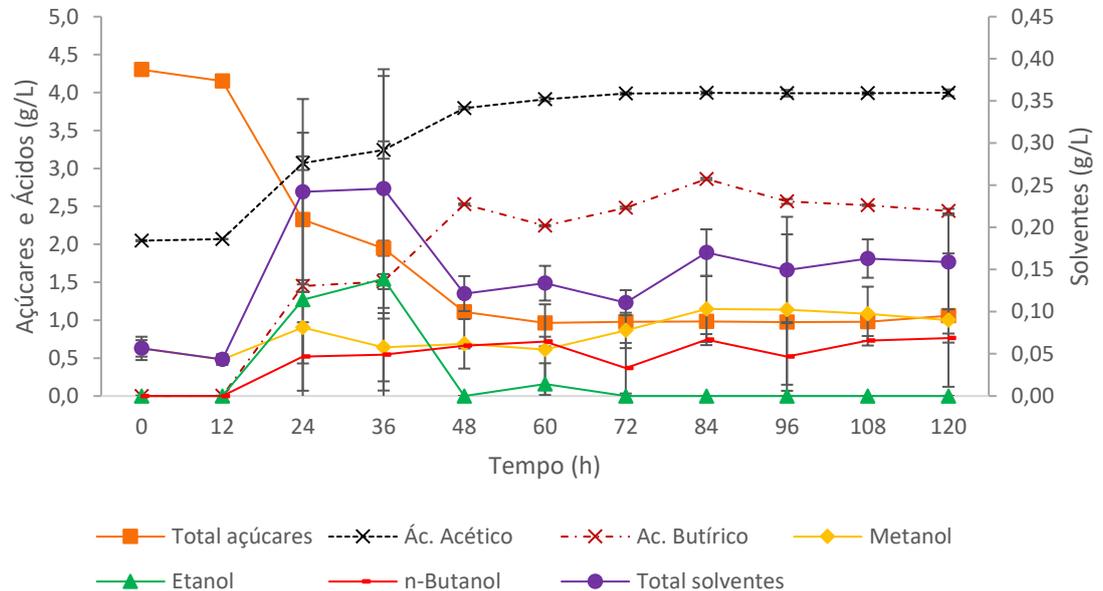
No final da fermentação controle obteve-se 0,237 g/L de butanol, 0,080 g/L de etanol totalizando 0,317 g/L de solventes (Figura 19). Quando o consumo de glicose atingiu aproximadamente 64,75 % em 36 h de fermentação iniciou-se a assimilação dos ácidos e a consequente produção de solventes.

**Figura 19.** Fermentação ABE controle com glicose como fonte de carbono.



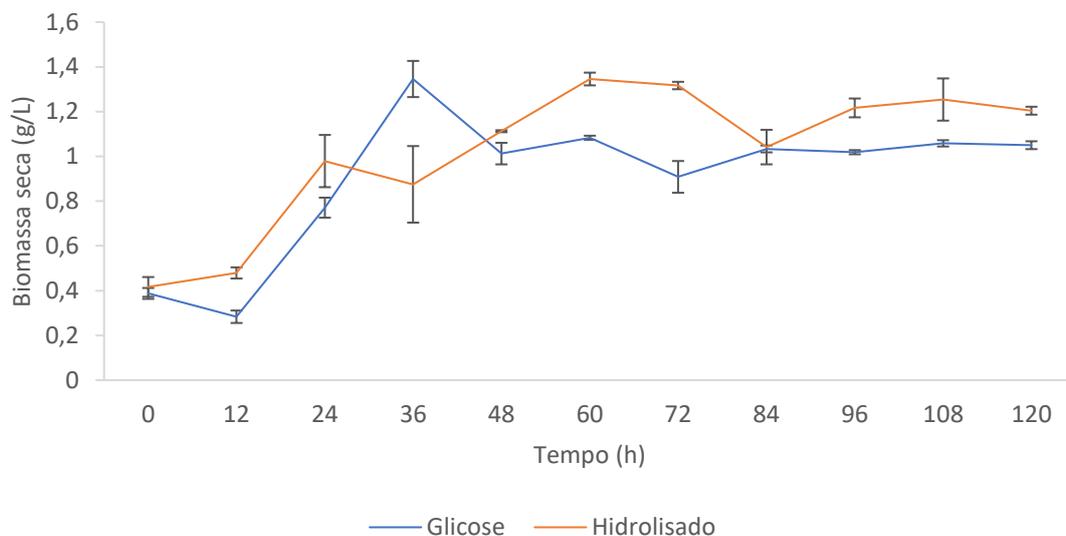
Na fermentação do hidrolisado (Figura 20) obteve-se 0,069 g/L de butanol (120 h); 0,139 g/L de etanol (36 h) e 0,097 g/L (108 h) de metanol. A assimilação dos ácidos ocorreu de maneira desigual, e já no início da fermentação (0 h) notou-se uma concentração inicial de ácido acético de 2,048 g/L e de metanol de 0,057 g/L, os quais provavelmente foram oriundos da etapa de hidrólise enzimática do bagaço de laranja. A produção de ácido butírico foi de 2,437 g/L.

**Figura 20.** Fermentação ABE do hidrolisado de laranja peletizado como fonte de carbono.



A partir de 48 h de fermentação o crescimento bacteriano (Figura 21) no controle manteve-se estável (1,01 g/L de biomassa seca), apresentando crescimento lento até o final da fermentação (1,05 g/L), este período foi onde ocorreu a maior assimilação dos ácidos e a consequente produção dos solventes, caracterizando a fase estacionária de crescimento. A fase acidogênica que geralmente ocorre dentro de 24 h e é caracterizada pelo crescimento rápido das células, ocorreu dentro de 36 h de fermentação para o controle (de 0,39 g/L para 1,35 g/L de biomassa seca) (ABD-ALLA; ELSADEC EL-ENANY, 2012; IBRAHIM et al., 2017).

O crescimento bacteriano na fermentação do hidrolisado ocorreu de maneira mais variável em relação ao controle. Este fato pode ser devido à dificuldade na assimilação dos açúcares disponíveis e a recalcitrância do substrato. Somente a partir de 50 h de fermentação, quando o consumo dos açúcares alcançou 75,16 %, observou-se a fase estacionária de crescimento (de 1,35 g/L para 1,20 g/L de biomassa seca), porém a produção de solventes não aumentou.

**Figura 21.** Biomassa seca durante a fermentação ABE

A fermentação controle teve um rendimento de butanol de 0,0716 g/g de bagaço, enquanto que no hidrolisado este rendimento foi de 0,02 g/g. Além do fato dos açúcares do hidrolisado de laranja serem menos assimilados pelo microrganismo, a concentração residual de ácidos também está relacionada aos açúcares presentes, manose e xilose por exemplo, acarretando em uma baixa concentração final de solventes. Em uma fermentação com hexoses e pentoses (glicose, arabinose, xilose e manose), a concentração máxima de solvente só foi alcançada com a suplementação do caldo fermentativo com  $\text{CaCO}_3$  (RAGANATI et al., 2015).

A presença de metanol inicial na fermentação do hidrolisado pode ser devido à presença, mesmo que baixa de pectina no bagaço de laranja. A pectina é constituída por grupos de carboxila variavelmente esterificados com metanol, solúvel em água. Quando em meio líquido a pectina pode degradar-se por desesterificação, onde ocorre a liberação de metanol e a liberação de pectatos e este processo ocorre principalmente em meio ácido. Outro processo que atua na degradação da pectina é denominado despolimerização e geralmente ocorre durante a hidrólise ácida ou enzimática, portanto na hidrólise enzimática e na fermentação a pectina provavelmente sofreu estes processos resultando na liberação de metanol (CANTERI et al., 2012; JONASSEN et al., 2013). A presença de ácido acético inicial também pode estar atrelada à pectina, uma vez que esta pode possuir várias unidades estruturais contendo ácido acético e ácidos fenólicos (CANTERI et al., 2012)

Durante a fermentação tanto do hidrolisado como do controle não foi detectada a produção de acetona e tal fato pode ter ocorrido devido à baixa concentração de substrato utilizada. Grimmmler et al. (2010) em seu estudo também não obtiveram produção de acetona durante a fermentação e este resultado estava atrelado à baixa concentração de substrato e a

quantidade mínima de meio que foi utilizada. Além disso, a alta concentração de ácidos (3,99 g/L ácido acético e 2,43 g/L de ácido butírico) pode ter inibido o crescimento do microrganismo o que conseqüentemente sessou a produção de solvente e durante as 120 h o microrganismo não conseguiu assimilar os ácidos precursores, bem como não conseguiu mais solventes a partir do ácido butírico.

Na fermentação controle a concentração final de ácido acético foi de 2,37 g/L e butírico de 3,86 g/L. Vale ressaltar que a cepa utilizada não é geneticamente modificada, portanto, não tolera altas concentrações de ácidos e/ou solventes. A concentração final elevada de ácidos na fermentação do hidrolisado também pode ser explicada pela tendência em que clostrídios solventogênicos tem mostrado em produzir ácidos quando a fermentação é conduzida utilizando hidrolisado de biomassa lignocelulósica como substrato (QURESHI et al., 2010).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da caracterização química, constatou-se que o bagaço de laranja peletizado pode ser uma alternativa como substrato para produção de moléculas de interesse biotecnológico, tais como açúcares, solventes e ácidos orgânicos.

Pré-tratamentos como autohidrólise, hidrólise ácido-diluído e ultrassom seguidos de hidrólise enzimática não foram eficientes na obtenção de açúcares redutores totais fermentáveis. Recomenda-se somente a hidrólise enzimática ao bagaço moído.

O hidrolisado proveniente da hidrólise enzimática continha glicose, xilose e arabinose e a cepa utilizada de *Clostridium beijerinckii*, mesmo não sendo geneticamente modificada, foi capaz de produzir butanol, etanol e ácidos tais como acético e butírico os quais são amplamente utilizados nas indústrias.

Biomassas lignocelulósicas provenientes de resíduos agroindustriais devem cada vez mais ser estudadas e caracterizadas de modo a conseguir diminuir sua recalcitrância e extrair seus açúcares fermentáveis, de modo a aproveitá-los e diminuir os impactos que estes causam quando são descartados indevidamente.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H.; ELSADEK EL-ENANY, A.-W. Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 172–178, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412001249>>.
- ABDEHAGH, N.; TEZEL, F. H.; THIBAUT, J. Separation techniques in butanol production: challenges and developments. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 222–246, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.003>>.
- ABIDI, N.; CABRALES, L.; HAIGLER, C. H. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 9–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.074>>.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids ( C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> ) by GC / FID : headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, n. May, p. 406–414, 2014.
- AMIRI, H.; KARIMI, K. Efficient dilute-acid hydrolysis of cellulose using solvent pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 33, p. 11494–11501, 2013.
- AMIRI, H.; KARIMI, K. Autohydrolysis: A promising pretreatment for the improvement of acetone, butanol, and ethanol production from woody materials. **Chemical Engineering Science**, v. 137, p. 722–729, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2015.07.020>>.
- AMIRI, H.; KARIMI, K.; ZILOUEI, H. Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 152, p. 450–456, 2014.
- AMORIM, A. B.; THOMAZ, M. C.; MARTINEZ, J. F.; RUIZ, S.; AUGUSTO, L.; PASCOAL, F.; WATANABE, P. H.; ALCIDES, R.; HUAYNATE, R. Determinação do valor nutricional da polpa cítrica para suínos em crescimento. p. 443–451, 2013.
- AZEVEDO, M.A.B. **Diferentes processo de branqueamento da celulose e seus efeitos nas propriedades físicas e cristalinidade**. Tese (Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química, 2012.
- AZNAR, J. S. **Reconocimiento de variedades de cítricos en campo**. Valencia: Generalitat Valencia, 1999. 189p.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 25–58, 1994.
- BELLIDO, C.; INFANTE, C.; COCA, M.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Efficient acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 332–338, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.082>>.

BLASCHEK, H. P. Clostridium. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 1, p. 444-448, 2014.  
BRANCO, A. F., ZEOULA, L. M., PRADO, I. N., et al. Valor nutritivo da polpa de citrus in natura para ruminantes. **Unimar**, v.16, (Supl. 1), p.37-48., 1994.

CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 309–322, 2017.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. de P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282012000200009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282012000200009&lng=pt&tlng=pt)>.

CAVICHIOLO, J. R. **Secagem do bagaço de laranja em secador tipo Flash**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

CHOI, I. S.; KIM, J. H.; WI, S. G.; KIM, K. H.; BAE, H. J. Bioethanol production from mandarin (Citrus unshiu) peel waste using popping pretreatment. **Applied Energy**, v. 102, p. 204–210, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.066>>.

CLEMENTS, R.; LELAND, H. An ion-exchange study of the free amino acids in the juices of six varieties of citrus. **J Food Sci**, v. 27, p. 20–25, 1962.

COLLARD, F.; BLIN, J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 594–608, 2014.

COSGROVE, D. J.; JARVIS, M. C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. August, p. 1–6, 2012.

DELLOMONACO, C.; FAVA, F.; GONZALEZ, R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 3, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-9-3>>.

DÜRRE, P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 639–648, 1998.

DÜRRE, P. Biobutanol: An attractive biofuel. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 12, p. 1525–1534, 2007.

EMBRAPA AGROENERGIA (2012) - Briquetagem e peletização de resíduos agrícolas e florestais.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 595–603, 2003.

FAO, O.; AGRÍCOLAS, P. OECD-FAO Agricultural Outlook 2015 Aspectos a destacar nos

produtos de base : Brasil. 2015.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; ALESON-CARBONELL, L.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E. Application of functional citrus by-products to meat products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 176–185, 2004.

FERREIRA, S.; DUARTE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 192–200, 2009.

FOO, K. Y. Value-added utilization of maize cobs waste as an environmental friendly solution for the innovative treatment of carbofuran. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 100, p. 295–304, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2016.01.020>>.

FREUDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, v. 183, p. 1152–1155, 1959.

GABRIEL, C. L.; CRAWFORD, F. M. Development of the Butyl-Acetic Fermentation Industry. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1163–1165, 1930.

GARCÍA, A.; ALRIOLS, M. G.; LLANO-PONTE, R.; LABIDI, J. Ultrasound-assisted fractionation of the lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6326–6330, 2011.

GARCÍA, R.; PIZARRO, C.; LAVÍN, A. G.; BUENO, J. L. Characterization of Spanish biomass wastes for energy use. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 249–258, 2012.

GREEN, E. M. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 337–343, 2011.

GRIMMLER, C.; HELD, C.; LIEBL, W.; EHRENREICH, A. Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of d-glucose and d-xylose. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 315–323, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.938>>.

GROHMAN, K.; BALDWIN, E. A.; BUSLIG, B. S., Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis, **Bioresource Technology**, 1995.

GU, Y.; LI, J.; ZHANG, L.; CHEN, J.; NIU, L.; YANG, Y.; YANG, S.; JIANG, W. Improvement of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* via expression of the *talA* gene encoding transaldolase from *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v. 143, p. 284–287, 2009.

GUERRERO, C. C.; CARRASCO DE BRITO, J.; LAPA, N.; OLIVEIRA, J. F. S. Re-use of industrial orange wastes as organic fertilizers. **Bioresource Technology**, v. 53, n. 1, p. 43–51, 1995.

HAHN, H.-D.; DÄMBKES, G.; RUPPRICH, N.; BAHL, H.; FREY, G. D. Butanols. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, p. 1–13, 2013. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a04\\_463.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a04_463.pub3)>.

HELUANE, H.; EVANS, M.R.; DAGHER, S.F.; Bruno-Barcena JM: Meta- analysis and functional validation of nutritional requirements of solventogenic clostridia growing under butanol stress conditions and coutilization of D-glucose and D-xylose. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 4473-4485, 2011.

HEITZ, M.; CAPEK-MÉNARD, E.; KOEBERLE, P. G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P.; TAYLOR, J. D.; YU, E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. **Bioresource Technology**, v. 35, n. 1, p. 23–32, 1991.

HIJOSA-VALSERO, M.; PANIAGUA-GARCÍA, A.I.; DÍEZ-ANTOLÍNEZ, R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2017.

IBRAHIM, M. F.; RAMLI, N.; KAMAL BAHRAIN, E.; ABD-AZIZ, S. Cellulosic biobutanol by Clostridia: challenges and improvements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1241–1254, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117308213>>.

ISIKGOR, H. FURKAN; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, p. 2–61, 2015.

JAFARI, Y.; AMIRI, H.; KARIMI, K. Acetone pretreatment for improvement of acetone, butanol, and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Applied Energy**, v. 168, p. 216–225, 2016.

JANG, Y. S.; MALAVIYA, A.; CHO, C.; LEE, J.; LEE, S. Y. Butanol production from renewable biomass by clostridia. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 653–663, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.104>>.

JOHN, I.; YARAGARLA, P.; MUTHAIAH, P.; PONNUSAMY, K.; APPUSAMY, A. Statistical optimization of acid catalyzed steam pretreatment of citrus peel waste for bioethanol production. **Resource-Efficient Technologies**, v. 0, p. 1–5, 2017.

JONASSEN, H.; TREVES, A.; KJØNIKSEN, A. L.; SMISTAD, G.; HIORTH, M. Preparation of ionically cross-linked pectin nanoparticles in the presence of chlorides of divalent and monovalent cations. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 10, p. 3523–3531, 2013.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 484–524, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373084/pdf/microrev00055-0136.pdf>>.

JØRGENSEN, H.; KUTTER, J. P.; OLSSON, L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 317, n. 1, p. 85–93, 2003.

KRAEMER, K.; HARWARDT, A.; BRONNEBERG, R.; MARQUARDT, W. Separation of butanol from acetone-butanol-ethanol fermentation by a hybrid extraction-distillation process. **Computers and Chemical Engineering**, v. 35, n. 5, p. 949–963, 2011.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: new insights. **Applied**

**Energy**, v. 88, n. 6, p. 1999–2012, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.055>>.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H. Bioresource Technology Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6434–6441, 2009.

LEE, S. Y.; PARK, J. H.; JANG, S. H.; NIELSEN, L. K.; KIM, J.; JUNG, K. S. Fermentative butanol production by clostridia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, 2008.

LI, C.; YOSHIMOTO, M.; OGATA, H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 5, p. 373–384, 2005.

LI, H.; XIONG, L.; CHEN, X.; LI, H.; QI, G.; HUANG, C.; LUO, M.; CHEN, X. Enhanced enzymatic hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation of sugarcane bagasse by combined diluted acid with oxidate ammonolysis pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 257–263, 2017.

LIGUORI, R.; VENTORINO, V.; PEPE, O.; FARACO, V. Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 597–611, 16 jan. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-7125-9>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 6, p. 530–545, 2012.

LOHRASBI, M.; POURBAFRANI, M.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7382–7388, 2010.

LU, X. B.; ZHANG, Y. M.; YANG, J.; LIANG, Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering and Technology**, v. 30, n. 7, p. 938–944, 2007.

MACEDO, C. A. B.; MIZUBUTI, I. Y.; MOREIRA, F. B. *et al.* Comportamento ingestivo de ovinos recebendo dietas com diferentes níveis de bagaço de laranja em substituição à silagem de sorgo na ração. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 6, p. 1910–1916, 2007.

MAITI, S.; GALLASTEGUI, G.; SURESH, G.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; DROGUI, P.; LEBIHAN, Y.; BUELNA, G.; VERMA, M.; SOCCOL, C. R. Hydrolytic pre-treatment methods for enhanced biobutanol production from agro-industrial wastes. **Bioresource**

**Technology**, v. 249, p. 673–683, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.132>>.

MARÍN, F. R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 736–741, 2007.

MATHARU, A. S.; DE MELO, E. M.; HOUGHTON, J. A. Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 123–130, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.039>>.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass ( part 1 ): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. July 2001, p. 37–46, 2002.

MESSINEO, A.; VOLPE, R.; MARVUGLIA, A. Ligno-cellulosic biomass exploitation for power generation: a case study in sicily. **Energy**, v. 45, n. 1, p. 613–625, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2012.07.036>>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MITCHELL, W. J. Carbohydrate assimilation by saccharolytic clostridia. v. 143, p. 245–250, 1992.

MITCHELL, W. J.; ALBASHERI, K. A.; YAZDANIAN, M. Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. March, p. 317–329, 1995.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G. Biofibres , biodegradable polymers and biocomposites : An overview. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 24, p. 1–24, 2000.

MORADI, F.; AMIRI, H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; EHSANI, M. R.; KARIMI, K. Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. **Fuel**, v. 112, p. 8–13, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.05.011>>.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MUNASINGHE, P. C.; KHANAL, S. K. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels. **Biofuels**, v. 101, n. 13, p. 79–98, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.098>>.

NAKASHIMA, G.T.; ADHMANN, I.C.S.; HANSTED, A.L.S.; BELINI, G.B.; WALDMAN, W.R.; YAMAJI, F.M. Materiais lignocelulósicos: caracterização e produção de briquetes. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 150-162, 2016.

NANDA, S.; GOLEMI-KOTRA, D.; MCDERMOTT, J. C.; DALAI, A. K.; G?KALP, I.; KOZINSKI, J. A. Fermentative production of butanol: Perspectives on synthetic biology. **New**

**Biotechnology**, v. 37, p. 210–221, 2017.

NAPOLI, F.; OLIVIERI, G.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P. Optimization of solvent recovery in the production of butanol by fermentation. **Environ. Eng. Manag. J.**, v. 11, p. 1499–1504, 2017.

NAQASH, F.; MASOODI, F.; WANI, S. M.; GANI, A. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin – A Review. **Carbohydrate Polymers**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>>.

NREL (National Renewable Energy Laboratory) - Laboratory Analytical Procedure, **Determination of total solids in biomass and total dissolved solid in liquid process samples**, 2018.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. [s.l.: s.n.]

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; NANJUNDASWAMY, A.; BANSAL, S.; SINGH, S.; KAUR, S.; BABBAR, N. Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1593–1601, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.111>>.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39–43, 2005.

PAGGIOLA, G.; STEMPOORT, S. Van; BUSTAMATE, J.; BARBERO, J. M. V.; HUNT, A. J.; CLARK, J. H. Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case-study around citrus waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2016.

PAPOUTSAKIS, E. T. Engineering solventogenic clostridia. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 420–429, 2008.

PARK, Y.; KANG, S.; LEE, J.; HONG, S.; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 761–766, 2002.

PEDROSO, A. M.; CARVALHO, M. P. Polpa cítrica e farelo de glúten de milho. In: PEDROSO, A. M.; **Treinamento on line: Subprodutos para ruminantes: estratégias para reduzir o custo de alimentação**. Piracicaba: AgriPoint; v.2, p. 1–35, 2006.

PEREIRA, R. C.; BANYS, V. L.; SILVA, A. C.; PEREIRA, R. G. A. Adição de polpa cítrica peletizada na ensilagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) cv. Cameroon. **Revista Universitária de Alfenas**, v. 5, p. 147–152, 1999.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International**

**Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

POURBAFRANI, M.; TALEBNIA, F.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolyzate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 8, p. 777–787, 2007.

QURESHI, N.; EZEJI, T. C.; EBENER, J.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; BLASCHEK, H. P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5915–5922, 2008.

QURESHI, N.; SAHA, B. C.; DIEN, B.; HECTOR, R. E.; COTTA, M. A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I - Use of barley straw hydrolysate. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 4, p. 559–565, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.12.024>>.

SÁNCHEZ *et al.* Fruit residue to ethanol. **BioResource**, v. 9, p. 1873-1885, 2014.

SUDHAKAR, D.; MAAINI, S. Isolation and characterization of mango peel pectins. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 24, p. 209-227, 1999.

RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; G??TZ, P.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P. Butanol production from hexoses and pentoses by fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v. 34, p. 146–155, 2015.

RAKOPOULOS, D. C.; RAKOPOULOS, C. D.; PAPAGIANNAKIS, R. G.; KYRITSIS, D. C. Combustion heat release analysis of ethanol or n-butanol diesel fuel blends in heavy-duty DI diesel engine. **Fuel**, v. 90, n. 5, p. 1855–1867, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2010.12.003>>.

RAMADOSS, G.; MUTHUKUMAR, K. Ultrasound assisted ammonia pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 33–41, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.013>>.

RAZERA, I.A.T. **Fibras Lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofenólica**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

RIBEIRO, P. R.; CARVALHO, J. R. M.; GERIS, R.; QUEIROZ, V.; FASCIO, M. Furfural-da biomassa ao laboratório de química orgânica. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1046–1051, 2012.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008.

RIVAS-CANTU, R. C.; JONES, K. D.; MILLS, P. L. A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges. **Waste Management & Research**, v. 31, n. 4, p. 413–420, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0734242X13479432>>.

RODRIGUES, P. H. M.; LOBO, J. R.; SILVA, E. J. A.; BORGES, L. F. O.; MEYER, P. M.;

DEMARCHI, J. J. A. de A. Efeito da inclusão de polpa cítrica peletizada na confecção de silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1751–1760, 2007.

RODRIGUES, S.; PINTO, G.A.S.; FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) from shell powder. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 869–872, 2007.

SANTOS, C. M.; DWECK, J.; VIOTTO, R. S.; ROSA, A. H.; DE MORAIS, L. C. Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 469–479, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.114>>.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>>.

SASAKI, C.; KUSHIKI, Y.; ASADA, C., NAKAMURA, Y. Acetone-butanol-ethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods using acorns and wood chips of *Quercus acutissima* as a carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 286–292. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.049>>.

SATARI, B.; KARIMI, K. Citrus processing wastes: environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 129, n. October 2017, p. 153–167, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>>.

SCHWANNINGER, M.; RODRIGUES, J. C.; PEREIRA, H.; HINTERSTOISSER, B. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, v. 36, n. 1, p. 23–40, 2004.

SIQUEIRA, E.J. **Compósitos de matriz estervinílica reforçados com fibras da *Luffa cylindrica* modificadas superficialmente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Rede temática em engenharia de materiais. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

SØRENSEN, A.; TELLER, P. J.; HILSTRØM, T.; AHRING, B. K. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6602–6607, 2008.

SOUSA, G.; CRE, M.; SØRENSEN, S. O.; KAYA, M. Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. **Annals of Botany**, v. 114, p. 1319–1326, 2014.

STINCO, C. M.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J.; VICARIO, I. M.; MELÍZANDEZ-MARTÍNEZ, A. J. Multivariate analyses of a wide selection of orange varieties based on carotenoid contents, color and in vitro antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 90, p. 194–204, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.005>>.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 3, p. 263–271, 2002.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 331-339, 2004.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5–6, p. 367–375, 1996.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, p. 472-499, 2007.

TAHERZADEH, M.J.; POURBAFANI, M.; LOHRASBI, M.; NIKLASSON, C.; Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products, **Bioresource Technology**, 2010.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T13 om-54 - Tappi Test Methods, 1991.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T211 om-93 - Tappi Test Methods, 1993.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T222 om-02 - Tappi Test Methods, 2002.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T222 om-88 - Tappi Test Methods, 1988.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T257 m-85 - Tappi Test Methods, 1985.

TASHIRO, Y.; TAKEDA, K.; KOBAYASHI, G. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 263–268, 2004.  
Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.monash.edu.au/science/article/pii/S1389172304002798>>.

TEMPLETON, D. W.; SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J.; SLUTIER, A. D. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks.1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9043–9053, 2010.

TERPÁKOVÁ, E.; KIDALOVÁ, L.; EŠTOKOVÁ, A.; ČIGÁŠOVÁ, J.; ŠTEVULOVÁ, N. Chemical modification of hemp shives and their characterization. **Procedia Engineering**, v. 42, n. August, p. 931–941, 2012.

TRACY, B. P.; JONES, S. W.; FAST, A. G.; INDURTHI, D. C.; PAPOUTSAKIS, E. T.

Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 364–381, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.008>>.

UYTTEBROEK, M.; VAN HECKE, W.; VANBROEKHOVEN, K. Sustainability metrics of 1-butanol. **Catalysis Today**, v. 239, p. 7–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2013.10.094>>.

VALLEJOS, M. E.; FELISSIA, F. E.; CURVELO, A. A. S.; ZAMBON, M. D.; RAMOS, L.; AREA, M. C. Chemical and physico-chemical characterization of lignins obtained from ethanol-water fractionation of bagasse. **BioResources**, v. 6, n. 2, p. 1158–1171, 2011.

VAN DER MERWE, A. B.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F.; KNOETZE, J. H. Comparison of energy efficiency and economics of process designs for biobutanol production from sugarcane molasses. **Fuel**, v. 105, p. 451–458, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.06.058>>.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K. *et al.* An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, n. 89, p. 913–933, 2010.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7119–7123, 2011.

VERTES, A.; QURESHI, N.; EDS, H. B. Book Review Biomass to Biofuels : Strategies for Global Industries. v. 39, n. 11, p. 2011, 2011.

VILLAREAL, M.; COCHRAN, R.C.; ROJAS-BOURRILLÓN, A.; MURILLO, O.; MUÑOZ, H.; POORE, M. Effect of supplementation with pelleted citrus pulp on digestibility and intake in beef cattle fed a tropical grass-based diet (*Cynodon nlemfuensis*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 125, p. 163–173, 2006.

VOLPE, M.; PANNO, D.; VOLPE, R.; MESSINEO, A. Upgrade of citrus waste as a biofuel via slow pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 115, p. 66–76, 2015.

WAL, H. van der; SPERBER, B.L.H.M.; HOUWELING-TAN, B.; BAKKER, R.R.C.; BRANDENBURG, W.; LÓPEZ-CONTRERAS, A.M. Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. **Bioresource Technology**, v.128, p. 431–437, 2013.

WALKER, D. J. F.; HEAP, J. T.; WINZER, K.; MINTON, N. P. A genetic assay for gene essentiality in *Clostridium*. **Anaerobe**, v. 42, p. 40–43, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.007>>.

WANG, X.; FANG, G.; HU, C.; DU, T. Application of ultrasonic waves in activation of microcrystalline cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2762–2767, 2007.

WANG, W.; CHEN, W.; ZOU, M.; LV, R.; WANG, D.; HOU, F.; FENG, H.; MA, X.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 234, p. 98–107, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.016>>.

WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J.; SEDEROFF, R. R.; STREET, N. W. Recent Advances in understanding lignin biosynthesis. **Annu. Rev. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v. 49, p. 585–609, 1998.

WU, H.; DAI, X.; ZHOU, S. L.; GAN, Y. Y.; XIONG, Z. Y.; QIN, Y. H.; MA, J.; YANG, L.; WU, Z. K.; WANG, T. L.; WANG, W. G.; WANG, C. W. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 70–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.090>>.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1959–1966, 2005.

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques : A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801–809, 2013.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; VEPSÄLÄINEN, J.; ZHANG, J.; PAPPINEN, A. Enhanced acetone-butanol-ethanol production from lignocellulosic hydrolysates by using starchy slurry as supplement. **Bioresource Technology**, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417309082>>.

YANG, Y.; NIE, X.; JIANG, Y.; YANG, C.; GU, Y.; JIANG, W. Metabolic regulation in solventogenic clostridia : regulators , mechanisms and engineering. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 905–914, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.012>>.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 903-908, 2009.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. October 2015, p. 475–501, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>>.

ZHENG, Y. N.; LI, L. Z.; XIAN, M.; MA, Y. J.; YANG, J. M.; XU, X.; HE, D. Z. Problems with the microbial production of butanol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1127–1138, 2009.

ZVERLOV, V. V.; BEREZINA, O.; VELIKODVORSKAYA, G. A.; SCHWARZ, W. H. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 587–597, 2006.