



## **Sacarificação e fermentação simultânea de tortas de algodão e girassol na produção de etanol de 2ª geração utilizando extrato holocelulolítico bruto produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257**

**Jéssica L. Pimenta<sup>3</sup>, Ricardo S. Santos<sup>1,2</sup>, Augusto A. G. Munayer<sup>4</sup>, Lílían Pantoja<sup>2,3</sup>, Alexandre S. Santos<sup>2,5</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM (ricardo.santos@ufvjm.edu.br); <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis – UFVJM/ UFU; <sup>3</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia - UFVJM; <sup>4</sup>Programa Jovens Talentos para a Ciência CAPES/UFVJM; <sup>5</sup>Departamento de Ciências Básicas - UFVJM

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de extratos enzimáticos holocelulolíticos produzidos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uso de torta de algodão como fonte de carbono e tempos de 7 e 9 dias de fermentação em fase sólida. Os extratos enzimáticos produzidos neste estudo com 7 e 9 dias de fermentação apresentaram 2,7 e 4,3 U/mL para endoglucanase, 4,1 e 6,6 U/mL para FPase, 59,9 e 17,2 U/mL para  $\beta$ -glucosidase e 199,5 e 75,7 U/ml para xilanase, respectivamente. Os extratos foram usados na sacarificação e fermentação simultânea (SFS) de tortas de algodão e girassol. Foram obtidos 7,95 g de etanol por 100g de torta de caroço de algodão sacarificada e fermentada, valor que correspondeu a um mosto com a concentração de 10,6 g/L de etanol, e 11,33 g de etanol por 100g de torta de girassol sacarificada e fermentada, valor que correspondeu a um mosto com a concentração de 15,1 g/L de etanol.

Palavras-chave: Celulases, Xilanases, Coprodutos, Bioetanol.

Área Temática: Biocombustíveis

## **Simultaneous saccharification and fermentation of cottonseed and sunflower seed cakes to 2nd generation ethanol production using crude holocellulolytic extract produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257**

### **Abstract**

*The objective of this study was to evaluate the potential of holocellulolytic enzyme extracts produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257 with the use of cottonseed cake as carbon source in times of 7 and 9 days of fermentation in solid phase. The enzyme extract produced in this study with 7 and 9 days showed 2.7 and 4.3 U / mL for endoglucanase, 4.1 and 6.6 U / mL for FPase, 59.9 and 17.2 U / ml for  $\beta$ -glucosidase and 199.5 and 75.7 U / ml for xylanase, respectively. The extracts were used in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cotton and sunflower seed cakes. There was obtained 7.95 g of ethanol per 100 g of saccharified and fermented cottonseed cake, value corresponding to a fermented must with a concentration of 10.6 g / L of ethanol, and 11.33 g of ethanol per 100 g of sunflower seed cake saccharified and fermented, value corresponding to a fermented must with a concentration of 15.1g / L of ethanol.*

*Key words: Cellulases, Xylanases, Co-products, Bioethanol.*

*Theme Area: Biofuels*



## 1 Introdução

O desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção de combustíveis líquidos renováveis é essencial para a redução da dependência mundial de recursos energéticos derivados de recursos fósseis. Diante deste panorama, cabe destacar que, em virtude do desenvolvimento na produção de biodiesel no Brasil, milhões de toneladas de tortas ou farelos oriundos do processamento desta oleaginosa são produzidas anualmente (GENTIL; SERRA; CASTRO; 2012). A existência e o destino desses coprodutos devem ser considerados como uma etapa importante do processo da extração de óleo para o biodiesel, pois, as legislações ambientais têm sido cada vez mais rigorosa em relação às unidades de beneficiamento da matéria vegetal com relação ao destino dos resíduos sólidos (RANGEL et al. 2004). Deste modo, torna-se evidente a importância de se investigar o potencial destas biomassas lignocelulósicas de forma a promover agregação de valor aos resíduos do processamento de oleaginosas, tornando a indústria do biodiesel mais competitiva. Uma alternativa atraente seria a possibilidade de utilizar as referidas biomassas em processos de produção de etanol de 2ª geração, assim como, em processos de produção de enzimas holocelulolíticas (VIAKARI; VEHMAANPERA; KOIVULA, 2012; VISSER, et al., 2011). O emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de economicamente interessante, contribui para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza (VISSER et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de extratos enzimáticos holocelulolíticos produzidos por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processos de sacarificação de tortas de algodão e girassol para produção de etanol de segunda geração.

## 2 Metodologia

### 2.1 Obtenção e preparo das tortas de algodão e girassol

A torta de algodão utilizada neste estudo foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – localizada no município de Montes Claros, MG. A torta de girassol foi doada pela indústria de biodiesel BIOSEP, localizada no município de Três Pontas, MG. Antes de serem avaliadas em processos de sacarificação, as referidas tortas foram inicialmente trituradas em moinho manual, posteriormente, secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 60 °C, por período de 48 horas. Em seguida os materiais obtidos foram cominuídos em moinhos de facas e peneirados em malhas de 0,5 e 0,2 mm.

### 2.2 Produção do extrato enzimático

O crescimento da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 para obtenção do inóculo destinado à produção de enzimas holocelulolíticas foi realizado por repicagem de cultura estoque em meio sólido PDA mantido a 30°C durante 7 dias. Os conídios produzidos foram recuperados assepticamente por adição de meio líquido segundo Mandels & Sternberg (1976) modificado, composto por (m/v): 0,7% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,20% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,03% de  $\text{CaCl}_2$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e 0,10% de solução de sais (5 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e 2,0 mg/L  $\text{CoCl}_2$ ), seguido de coleta com auxílio de pipeta Pasteur, filtração em gaze estéril e contagem de esporos em câmara de Neubauer. A suspensão foi devidamente diluída de modo que a concentração final do inóculo fosse  $1 \times 10^7$  conídios/grama de torta utilizada no processo fermentativo.

A produção do extrato enzimático neste trabalho foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) em condição otimizada conforme descrito por Santos (2015). Para tanto,



o processo de FES foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 30,0 gramas de torta de caroço de algodão, acrescidos de 56,0 mL de inóculo (razão sólido/líquido de 35%). Estes sistemas foram incubados a 30°C em estufa B.O.D. durante 7 e 9 dias. A obtenção do extrato enzimático bruto foi realizada por adição de 200 ml de tampão acetato pH 4,5, 50 mmoles/L, em cada frasco, seguido de agitação vigorosa em vórtex e filtração em sistema a vácuo. O extrato bruto produzido com 7 dias de FES foi denominado EB1 e o extrato produzido com 9 dias de FES foi denominado EB2. Ambos foram armazenados em gelo até determinação das atividades de endoglucanase, FPase,  $\beta$ -glucosidase (GHOSE, 1987) e xilanase (BAILEY et al., 1992) e utilização nos processos de sacarificação e fermentação simultânea.

### 2.3 Processo de sacarificação e fermentação simultânea

Os ensaios de sacarificação e fermentação simultânea foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 20,0 g de torta de girassol ou algodão, os quais foram previamente esterilizados em autoclave. A estes sistemas foram adicionados 150 mL dos extratos enzimáticos produzidos (EB1 ou EB2), perfazendo uma razão sólido/líquido de 11,8%. Inicialmente, em um período de 24 horas, foi realizada a sacarificação das biomassas avaliadas em estufa incubadora sob agitação de 120 rpm a temperatura de 50°C. Para efeito de comparação foram realizados testes hidrolíticos utilizando o produto comercial Celluclast® (Novozymes) nas mesmas condições experimentais. O produto Celluclast® foi devidamente diluído de modo a se obter o valor de atividade FPásica próxima aos extratos produzidos neste trabalho. Antes e após 24 horas de sacarificação foram retiradas alíquotas para determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959). A eficiência hidrolítica no período supracitado foi calculada considerando a quantidade de celulose e hemicelulose presentes nas tortas e a diferença entre as concentrações de açúcares redutores inicial e após os tempos de sacarificação avaliados, conforme equação 1.

$$Ef_{24h} = \frac{AR_{sac} (g/100g) - AR_{in} (g/100g)}{Polissacarídeos (g/100g)} \quad (1)$$

*Ef<sub>24h</sub>: Eficiência hidrolítica após 24 horas de sacarificação*

*AR<sub>sac</sub>: Açúcares redutores (g) liberados na sacarificação de 100 g de torta.*

*AR<sub>in</sub>: Açúcares redutores (g) antes do processo de sacarificação de 100 g de torta*

*Polissacarídeos: Celulose e hemicelulose (g) presentes em 100 g de torta.*

Os hidrolisados obtidos foram submetidos à fermentação, por 120 horas, com o inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* a 3% (fermento biológico desidratado marca Fleishmann®). O processo de sacarificação e fermentação simultânea foi conduzido nos mesmos sistemas descrito anteriormente, acrescidos do inóculo e acoplados a fermentômetros, que permitem a saída do CO<sub>2</sub> sem permitir a entrada de ar.

O desprendimento de CO<sub>2</sub> foi acompanhado por meio de sucessivas pesagens do sistema fermentativo no intervalo de 120 horas. As pesagens foram realizadas em intervalos de 30 minutos nas primeiras 6 horas, posteriormente, intervalos de 1 hora até 12 horas de fermentação, 2 horas até 24 horas de e 4 horas até o final do processo. Os valores de CO<sub>2</sub> obtidos ao longo do tempo foram utilizados para estimar o perfil de produção do etanol segundo a estequiometria metabólica do processo fermentativo, na qual para cada 0,499g de CO<sub>2</sub> liberados é produzido 0,511g de etanol.

Ao final do processo alíquotas foram coletadas e analisadas quanto aos teores de etanol e açúcares redutores (MILLER, 1959). Para determinação do teor de etanol, as amostras foram pré-destiladas e posteriormente quantificadas segundo método descrito por



Pilone (1985). Os valores de eficiência hidrolítica final (*Eff*) foram calculados conforme equação 15.

$$Eff = \frac{((Etanol \text{ g}/100\text{ g}) \times 2) + ARfin \text{ (g}/100\text{ g})}{Polissacarídeos \text{ (g}/100\text{ g})}$$

1

*Ef2: Eficiência hidrolítica final;*

*Etanol (g/100g): Etanol (g) no final do processo de SSF referente a 100 g de torta.*

*ARfin: Açúcares redutores (g) no final do processo de SSF referente a 100 g de torta.*

*Polissacarídeos: Celulose e hemicelulose (g) presentes em 100 g de torta.*

Os teores de celulose presentes nas tortas de algodão e girassol utilizados para as determinações da *Ef24h* e *Eff* foram 33,29% ± 1,13% e 23,22% ± 0,30%, respectivamente (Trabalho submetido ao evento). Já os percentuais de hemicelulose para torta de algodão e girassol foram, respectivamente, 8,76% ± 0,92% e 20,55% ± 1,22% (Trabalho submetido ao evento).

### 3 Resultados e discussão

Os valores das atividades enzimáticas encontradas nos extratos produzidos com 7 dias de FES (EB1) e 9 dias de FES (EB2), expressos em unidades por grama de substrato (U/g torta) e unidades volumétricas (U/mL) encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de atividades para os extratos enzimáticas produzidos por *A. tubingensis* com 7 e 9 dias de fermentação em estado sólido

Enzima	EB1		EB2	
	(U/g torta)	(U/mL)	(U/g torta)	(U/mL)
Endoglucanase	18,1	2,7	28,5	4,3
FPase	27,6	4,1	44,0	6,6
β-glicosidase	399,4	59,9	114,9	17,2
Xilanase	1330,2	199,5	504,9	75,7

EB1 e EB2: Extratos enzimáticos produzidos por *A. tubingensis* com 7 e 9 dias de FES, respectivamente.

Observou-se que o sistema de sacarificação que apresentou a maior quantidade de FPase por grama de biomassa a ser sacarificada (U/g) foi o extrato EB2, com 50 U/g. Por tanto, o extrato enzimático Celluclast®, utilizado como parâmetro de comparação nos processos de sacarificação, foi diluído de modo que o processo hidrolítico contivesse 50 U/g. Com a referida diluição as atividades das enzimas endoglucanase, β-glicosidase e xilanase no sistema de sacarificação utilizando o produto comercial Celluclast® foram 77,2 U/g, 110,3 U/g e 583,4 U/g, respectivamente.

Os teores de açúcares redutores encontrados antes e após 24 horas de sacarificação das tortas de algodão e girassol utilizando os extratos enzimáticos EB1 e EB2 produzidos por *A. tubingensis* e o produto Celluclast® encontram-se expressos na Tabela 2. Considerando os teores de celulose e hemicelulose presentes nas tortas de algodão e girassol e a diferença entre as concentrações inicial e após 24 horas de sacarificação, podem-se calcular os valores das eficiências hidrolíticas no referido período (*EF24h*). Os resultados relativos a teores de açúcares redutores no final da fermentação, concentração de etanol no mosto fermentativo e rendimento final da sacarificação (*Eff*) também foram expressos na Tabela 2.



Tabela 2 - Concentrações de açúcares redutores no início, após 24 horas de sacarificação e no final do processo de sacarificação e fermentação simultânea, bem como a quantidade de etanol produzido e rendimento de cada processo.

Biomassa	Extrato Enzimático	AR in g/L	AR sac g/L	ARfin g/L	Etanol g/L	Ef24h %	Eff %
Torta algodão	EB1	9,6	21,1	8,3	10,0	21,17	34,24
	EB2	9,1	24,0	6,7	10,6	27,51	34,68
	Celluclast®	4,9	18,9	4,9	9,6	25,71	35,32
Torta girassol	EB1	13,5	30,6	1,81	15,1	29,78	60,96
	EB2	13,0	24,8	15,5	13,5	20,59	51,59
	Celluclast®	6,8	16,0	8,2	9,5	16,03	35,69

EB1 e EB2: Extratos enzimáticos produzidos por *A. tubingensis* com 7 e 9 dias de FES, respectivamente; ARfin: teor de açúcares redutores encontrados após o processo fermentativo; AR in: teor inicial de açúcares redutores; AR sac: teor de açúcares redutores encontrados após 24 horas de sacarificação; EF24h: Eficiência da sacarificação da fração holocelulósica após 24 horas Eff: percentual sacarificado da celulose/hemicelulose presentes nas tortas de algodão e girassol após sacarificação e fermentação simultânea.

A utilização do extrato EB2 apresentou maior eficiência hidrolítica (27,51%) na sacarificação da torta de algodão no período de 24 horas quando comparada com a utilização do extrato EB1 (21,17%). Vale ressaltar que a eficiência observada no processo utilizando o extrato EB2 foi semelhante à observada quando utilizado o produto comercial Celluclast®. Tais valores de eficiências estão contidas entre a faixa relatada por Fockink e colaboradores (2015), que obtiveram conversões de glucano de 18 a 40% a partir de resíduos de descaroçadeira de algodão pré-tratados em 24 horas de sacarificação utilizando 11,5 U de FPase/g do produto comercial Cellic CTec2®. Valores semelhantes de eficiência foram obtidos por Plácido et al. (2013), que alcançou valores de conversão de 23,4% em 96 h para resíduos de descaroçadeiras de algodão pré-tratados sequencialmente por ultra-som, extração de água quente e enzimas ligninolíticas.

A utilização do extrato EB1 apresentou maior eficiência hidrolítica (29,78%) na sacarificação da torta de girassol no período de 24 horas quando comparada com a utilização do extrato EB2 (20,59%). Este fato deve-se provavelmente às maiores quantidades de xilanase presentes no extrato EB1 (Tabela 24), que contribuiu com uma desconstrução mais efetiva da hemicelulose presente na torta de girassol. Vale ressaltar que os valores de eficiência observados tanto no processo utilizando o extrato EB1 quanto no processo utilizando o extrato EB2 foram superiores à eficiência observada quando utilizado o produto comercial Celluclast® (16,03%). Este fato também é devido às quantidades maiores de xilanase nos extratos EB1 e EB2 quando comparado ao produto comercial Celluclast® (Tabela 2). Tais valores de eficiências foram inferiores ao relatado por Soto e colaboradores (1994), que obtiveram conversões de 50% a partir de resíduos de girassol pré-tratados em 72 horas de sacarificação utilizando 25 U de FPase/g do produto comercial Celluclast®. Valores semelhantes de eficiência foram obtidos por Sharma e colaboradores (2002), que relataram de conversão hidrolítica de 32,1% em 24 h para hastes de girassol pré-tratados por vapor e hidróxido de sódio, utilizando 10 U de FPase/g produzida por *T. reesei* Rut-C 30.

É importante destacar que os nos estudos supracitados as biomassas utilizadas sofreram algum tipo de pré-tratamento físico ou químico, o que contribui com o aumento da eficiência da sacarificação. No entanto estes pré-tratamentos podem apresentar custos elevados para o processo. Além de expressiva, a eficiência hidrolítica dos extratos produzidos neste estudo sobre as tortas não tratadas constitui-se em uma atraente estratégia para diminuição de custos do processo de sacarificação, tendo em vista que a etapa de pré-tratamento não se mostrou necessária.

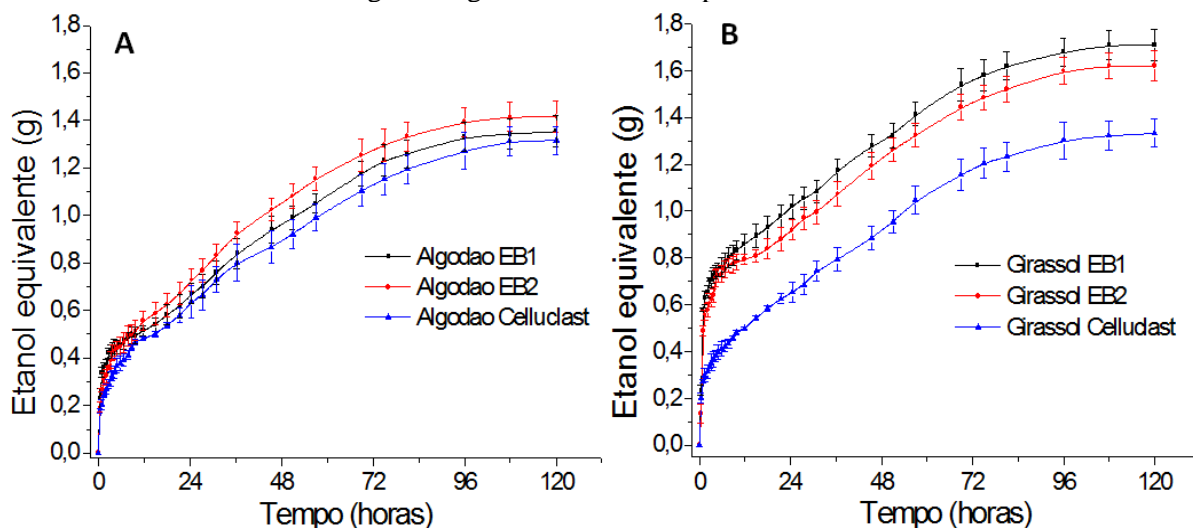
O perfil do processo fermentativo, expresso graficamente em função da quantidade de etanol produzido equivalente ao CO<sub>2</sub> desprendido, pode ser observado na Figura 1. Neste





gráfico percebe-se a habilidade da levedura em utilizar os carboidratos presentes no meio de fermentação, a qual refletiu em uma produção de etanol com maior intensidade nas seis primeiras horas. Este fato está atrelado principalmente à presença de glicose, um açúcar facilmente fermentável.

Figura 1 - Curvas do progresso de produção de etanol obtidos com base no desprendimento de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) durante o processo fermentativo de meios provenientes do hidrolisado de tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratados.



Nos gráficos representados pelas Figuras 22 A e B pode-se observar a habilidade da levedura em utilizar os carboidratos presentes no meio de fermentação. A produção de etanol ocorreu rapidamente nas seis primeiras horas. Este fato está atrelado à condição de aproximadamente um terço dos açúcares redutores presentes nas amostras ser constituído por glicose, um açúcar facilmente fermentável.

Considerando os resultados da fermentação do hidrolisado de torta de algodão percebe-se que não houve diferença significativa entre a produção de etanol utilizando os diferentes extratos enzimáticos produzidos neste estudo (EB1 e EB2) e o produto comercial Celluclast®. Já com base nos resultados da fermentação do hidrolisado da torta de girassol pode-se inferir que a maior produção de etanol foi no processo que utilizou o extrato enzimático EB1, seguido do processo que utilizou o extrato EB2. Em ambos os processos a produção de etanol foi maior que a produção de etanol utilizando o produto comercial Celluclast®.

É importante salientar que a produção de etanol utilizando tanto a torta de algodão quanto a torta de girassol e quaisquer extratos enzimáticos foi estequiometricamente superior à quantidade de açúcares disponíveis após o período de 24 horas de fermentação. Deste modo, pode-se afirmar que a sacarificação holocelulolítica prosseguiu além do período de 24 horas, ocorrendo simultaneamente ao processo fermentativo. Este fato também pode ser confirmado ao observar o aumento significativo da eficiência hidrolítica ocorrida no final do processo (Ef2) (Tabela 26) quando comparada à eficiência hidrolítica após 24 horas de sacarificação (Ef1) (Tabela 25). Com base nestes resultados pode-se observar que a conversão hidrolítica aumentou 62%, 79% e 73% nos processos de sacarificação e fermentação simultânea da torta algodão utilizando os extratos EB1, EB2 e Celluclast®, respectivamente. Já a conversão hidrolítica nos processos de sacarificação e fermentação simultânea da torta de girassol utilizando os extratos EB1, EB2 e Celluclast® aumentaram, respectivamente, 49%, 40% e 45%.



A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada foi adequada para fermentar os açúcares presentes no hidrolisado, no entanto, o uso de micro-organismos capazes de fermentar pentoses e hexoses poderia melhorar significativamente a eficiência do sistema, tendo em vista que os extratos enzimáticos produzidos, sobretudo o EB1, apresentaram grandes quantidades de enzimas xilanolíticas.

Relacionando a massa de etanol proveniente do hidrolisado da sacarificação da torta de algodão com uso do extrato EB2 e a massa da torta de algodão utilizada no processo, foi possível obter uma produção média de 7,95 g de etanol por 100g de torta hidrolisada. Com nestes resultados é possível projetar uma produção de 101 litros de etanol para cada tonelada de torta de caroço de algodão. Já a relação entre a massa de etanol proveniente do hidrolisado da sacarificação da torta de girassol com uso do extrato EB1 e a massa da torta de girassol utilizada no processo, indica uma possível produção média de 11,33 g de etanol por 100g de torta hidrolisada. A projeção de produção de etanol por tonelada de torta de girassol, com base nestes resultados, seria de 144 litros. É válido ressaltar que os valores de produção de etanol a partir de torta de algodão e girassol foram superiores aos obtidos na utilização de cana de açúcar ( $70 \text{ L.ton}^{-1}$ ) (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010).

Deve-se salientar que uma das potenciais aplicações dos óleos de algodão e girassol tem sido na produção de biodiesel. Ao considerar que a extração de uma tonelada óleo de girassol gera cerca de duas toneladas de torta (BERGMANN et al., 2013), pode-se inferir que a produção de etanol utilizando essa quantidade de torta seria de 288 litros. Já a produção de etanol de torta de caroço de algodão seria de 404 litros para cada tonelada de óleo produzido, tendo em vista que para a extração de uma tonelada óleo é gerado 4 toneladas de torta (BERGMANN et al., 2013). Com base nestas projeções e considerando que a demanda estequiométrica de etanol para produção de biodiesel por transesterificação é de aproximadamente 200 litros por tonelada de óleo (VISSER et al., 2011) pode-se afirmar que os processos de sacarificação e fermentação das tortas de girassol e algodão empregados neste trabalho teriam a capacidade de suprir a totalidade da demanda de álcool utilizado na rota de produção de biodiesel etílico.

#### 4 Conclusão

Os extratos enzimáticos produzidos neste trabalho demonstraram ser eficazes nos processos de sacarificação e fermentação simultânea das tortas de algodão e girassol. O uso destas biomassas levou a produção de quantidades expressivas de etanol de 2ª geração, possibilitando uma alternativa atraente para agregar valores a coprodutos de baixo custo. Além do mais, os valores de etanol obtidos a partir de tortas de girassol e algodão demonstraram ser capazes de atender a demanda de álcool nas próprias usinas de biodiesel, podendo ser incorporada à cadeia produtiva como forma de agregar valor a um coproduto abundante.

#### 5 Referências

- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.**, v. 23, p. 257–270, 1992.
- BERGMANN, J.C.; TUPINAMBA, D.D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411–420, 2013.



BERGMANN, J.C.; TUPINAMBA, D.D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411–420, 2013.

FOCKINK, D.H.; MACENO, M.A.C.; RAMOS, L.P. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 91–96, 2015.

GENTIL, R. de M.; SERRA, J. C. V.; CASTRO, R. B. de. Resíduos sólidos orgânicos provenientes da extração de oleaginosas para biodiesel e seus potenciais de uso. **Geoambiente on-line**, n. 18, p. 127-142., 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P., The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 17-24, 2010.

MANDELS, M.; STERNBERG D. Recent advances in cellulase technology. **J Ferment Technol**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.

PILONE, G. J. Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem.**, vol. 68, p. 188-190, 1985.

PLÁCIDO, J.; IMAM, T.; CAPAREDA, S. Evaluation of ligninolytic enzymes, ultrasonication and liquid hot water as pretreatments for bioethanol production from cotton gin trash. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 203–208, 2013.

SANTOS, R. S. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fonte de carbono.** Tese (doutorado) do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2015.

SHARMA, S. K.; KALRA, K.L.; GREWAL H.S. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 237 – 243, 2002.

SOTO, M.L.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; LEMA, J.M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, v. 49, p.53-59, 1994.

VIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry, **Biomass and Bioenergy**, p. 1-12, 2012.

VISSER, E. M.; OLIVEIRA FILHO, D.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 489-494, 2011.