

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia dos Matérias**



Dissertação

**BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A PRODUÇÃO DE BIOÓLEO E BIODIESEL A  
PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR**

**Josiane Pinheiro Farias**

**Pelotas, 2022**

**Josiane Pinheiro Farias**

**Bioteχνologias aplicadas a produção de bioóleo e biodiesel a partir de bagaço  
de cana-de- açúcar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (Área de concentração: Biomateriais).

Orientador: Prof. Dr. Robson Andrezza

Coorientador: Prof. Dr. Benedict C. Okeke

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F224b Farias, Josiane Pinheiro

Bioteχνologias aplicadas a produção de bioóleo e biodiesel a partir de bagaço de cana-de-açúcar / Josiane Pinheiro Farias ; Robson Andreazza, orientador ; Benedict C. Okeke, coorientador. — Pelotas, 2022.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Explosão a vapor. 2. Biomassas lignocelulósicos. 3. Bagaço de cana-de-açúcar. 4. Hidrólise de múltiplo estágio. 5. Trichoderma SG2. I. Andreazza, Robson, orient. II. Okeke, Benedict C., coorient. III. Título.

CDD : 620.11063

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figs Machado CRB: 10/1612

Josiane Pinheiro Farias

Bioteχνologias aplicadas a produção de bioóleo e biodiesel a partir de bagaço de  
cana-de-açúcar

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18 de Fevereiro de 2022

Banca Examinadora:

.....

Prof. Dr. Robson Andrezza (Orientador)

Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....

Prof. Dr. Benedict C. Okeke (Coorientador)

PhD in Bioscience and Biotechnology by University of Strathclyde, Glasgow,  
Scotland

.....

Prof. Dr. Jalel Labidi

Doutor em Engenharia de Processos pelo Institut National Polytechnique de  
Lorraine, França

.....

Prof. Dr. Willian César Nadaleti

Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina

## **Agradecimentos**

A minha mãe Jaci Pinheiro Farias, pela campanha incondicional em todos os momentos da minha vida, na alegria de uma viagem e no apoio aos estudos.

Ao professor Robson, pela orientação, paciência e confiança para tornar este trabalho possível.

Ao compartilhamento do trabalho e conhecimento com professor Benedict.

A Fernanda e Marcela pela parceria de trabalho e pela partilha dos momentos especiais do projeto.

A Carol pela ajuda neste projeto e outros, principalmente como comunicadora.

A Thays pelas mensagens de otimismo e positividade.

Aos colegas do Laboratório, pela parceria e pelos ótimos momentos compartilhados.

Muito obrigada!

## Resumo

FARIAS, Josiane Pinheiro. **Biotechnologias aplicadas a produção de bioóleo e biodiesel a partir de bagaço de cana de açúcar**. 2022. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O biodiesel é um combustível promissor como substituto do diesel, pois apresenta baixas emissões de CO<sup>2</sup> e é produzido a partir de recursos renováveis. O bagaço de cana-de-açúcar é um tipo de resíduo de biomassa lignocelulósica produzido a partir da manufatura do açúcar e álcool. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial degradante de biomassa lignocelulósica por enzimas microbianas e produzir biodiesel a partir do bagaço de cana-de-açúcar com processo biotecnológico utilizando uma levedura acumuladora de lipídios como precursora. O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor foi submetido à hidrólise enzimática utilizando enzimas brutas proveniente de *Trichoderma* SG2 (T SG2) com ou sem suplementação com uma enzima comercial (Cellic CTec2). A sinergia das celulase e xilanase de *Trichoderma* SG2 com a enzima comercial Cellic CTec2 foi promissora na obtenção de açúcares a partir do bagaço de cana pré-tratado. Um processo de hidrólise multiestágio, apresentou melhores resultados ao proceder com uma completa separação das frações e com a reposição de enzima, sendo os valores obtidos em cada estágio foi 24,98gL<sup>-1</sup> de açúcar no primeiro, e 26,92gL<sup>-1</sup> de açúcar no segundo. Na última etapa de hidrólise da biomassa residual, foram registrados 26,23gL<sup>-1</sup> de açúcar; maximizando assim a produção de açúcares fermentescíveis a partir do bagaço. Foi avaliado o cultivo da espécie *Rhodotorula* R1 em hidrolisado enzimático (BH) de bagaço de cana-de-açúcar para produção de lipídios. O enriquecimento do hidrolisado com glicose comercial promoveu um aumento no acúmulo de lipídeos, sendo recuperado 7,69% de lipídios utilizando um meio de cultura contendo 20gL<sup>-1</sup> de peptona, 20gL<sup>-1</sup> de açúcar comercial e 0,93gL<sup>-1</sup> de nitrogênio (BH+P<sub>20</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0,93</sub>). A acumulação de lipídios aumentou para 10,50% em uma alta razão carbono-nitrogênio (BH+Y<sub>10</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0,2</sub>), sendo a composição do meio de 10gL<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20gL<sup>-1</sup> de açúcar comercial e 0,2gL<sup>-1</sup> de nitrogênio. Os lipídeos produzidos por *Rhodotorula* espécies R1, é composto principalmente de ácidos graxos de cadeia longa, sendo os principais Elaidic, Palmítico e Estearato (C16 e C18). Ácidos graxos semelhantes são encontrados em óleos vegetais atualmente utilizados para produção de biodiesel e indicam que os lipídios de levedura são matéria-prima adequada para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Explosão a vapor. Biomassas lignocelulósicas. Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrólise de múltiplo estágio. *Trichoderma* SG2. *Rhodotorula* espécie R1.

## Abstract

FARIAS, Josiane Pinheiro. **Biotechnologies applied to the production of bio oil and biodiesel from sugarcane bagasse**. 2022. 79f. Dissertação (Mestrado Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Biodiesel is a promising fuel to substitute diesel, with lower carbon emissions and is produced from renewable resources. Sugarcane bagasse is a type of lignocellulosic biomass waste produced from the manufacture of sugar and alcohol. The aim of this study was to evaluate the degrading potential of lignocellulosic biomass by microbial enzymes and to produce biodiesel from sugarcane bagasse with a biotechnological process using a lipid-accumulate yeast. Sugarcane bagasse pre-treated by steam explosion was subjected to enzymatic hydrolysis using crude enzyme from *Trichoderma* SG2 (T SG2) with or without supplementation with a commercial enzyme (Cellic CTec2). The synergy of *Trichoderma* SG2 cellulase and xylanase with the commercial enzyme Cellic CTec2 was promising in obtaining sugars from pre-treated sugarcane bagasse. A multistage hydrolysis process presented better results when proceeding with a complete separation of the fractions and with the replacement of enzyme, the values obtained in each stage being 24.98gL<sup>-1</sup> of sugar in the first, 26.92gL<sup>-1</sup> of sugar in the second. In the last stage of hydrolysis of residual biomass, 26.23gL<sup>-1</sup> of sugar were recorded; thus, maximizing the production of fermentable sugars from bagasse. The cultivation of the *Rhodotorula* R1 in enzymatic hydrolyzate (BH) of sugarcane bagasse for lipid production was evaluated. The enrichment of the hydrolyzate enzyme with commercial glucose promoted an increase in the accumulation of lipids, recovering 7.69% of lipids, using a culture medium containing 20gL<sup>-1</sup> of peptone, 20gL<sup>-1</sup> of commercial sugar and 0.93gL<sup>-1</sup> of nitrogen (BH+P<sub>20</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0.93</sub>). Lipid accumulation increased to 10.50% at a high carbon-nitrogen ratio (BH+Y<sub>10</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0.2</sub>), with the composition of the medium being 10gL<sup>-1</sup> of yeast extract, 20gL<sup>-1</sup> of commercial sugar and 0.2gL<sup>-1</sup> of nitrogen. The lipids produced by *Rhodotorula* species R1 are mainly composed of long-chain fatty acids, the main ones being Elaidic, Palmitic and Stearate (C16 e C18). Similar fatty acids are found in vegetable oils currently used for biodiesel production and indicate that yeast lipids are suitable for biodiesel production from raw materials.

Keywords: Steam explosion. Lignocellulosic biomass. Sugarcane bagasse. Multistage hydrolysis. *Trichoderma* SG2. *Rhodotorula* species R1

## Lista de Figuras

Figura 1	Composição da cana-de-açúcar	18
Figura 2	Estrutura da biomassa lignocelulósica	20
Figura 3	Constituintes fenólicos da lignina.	21
Figura 4	Representação da estrutura da hemicelulose	22
Figura 5	Estrutura da celobiose e da ligação $\beta$ -glucosídica na celulose	23
Figura 6	Diagrama com diferentes métodos de pré- tratamento de materiais lignocelulósicos	24
Figura 7	Diagrama do crescimento celular e acúmulo de lipídeo por microrganismos oleaginosos	33
Figura 8	Tecnologias de ruptura da parede celular	35
Figura 9	Evolução Brasileira de consumo de energia por setor	36
Figura 10	Geração de energia por tipo de fonte em países da América Latina	37
Figura 11	Reação geral de transesterificação	39
ARTIGO 1		
Figure 1	Comparison of enzymatic hydrolysis using an enzyme complex produced by <i>T. SG2</i> and <i>T. SG2</i> supplemented with Cel2 for solids ratios of 10 and 15%	45
Figure 2	Effect of different doses of enzyme on the hydrolysis of SESCOB	47
Figure 3	Three-stage enzymatic hydrolysis	47
Figure 4	Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum for the steam explosion pretreated bagasse (SESCB), hydrolyzed with water (HW-ESCOB) and hydrolyzed with enzymes (EH-SESCB).	49
Figure 5	X-ray diffractograms for SESCOB, steam explosion pre-treated bagasse and ETSCB, bagasse pre-treated by steam explosion subjected to the action of enzymes.	50



## Lista de tabelas

Tabela 1	Composição química da palha e bagaço de cana-de-açúcar	19
Tabela 2	Composição Bioquímica das Biomassas Lignocelulósicas	20
Tabela 3	Ácidos graxos saturados e insaturados comumente encontrados em óleos e gorduras	30
Tabela 4	Perfil graxo alguns microrganismos oleaginosos	31
Tabela 5	Produção de lipídeos por leveduras em substrato de melaço	32
ARTIGO 1		
Tabela 1	Steam exploded sugarcane bagasse (SESCB) hydrolysis parameters.	42
Tabela 2	Parameters analyzed in lipid production by <i>Rhodotorula R1</i>	43
Tabela 3	Metabolite profiles of sugarcane bagasse hydrolysate (BH)	48
Tabela 4	Cell mass concentration, lipid production by <i>Rhodotorula R1</i> cultured sugarcane bagasse hydrolysate (BH) at 30C°, 130rpm for 5days.	52

## Lista de Abreviaturas e siglas

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos Livres
BH	Bagaço hidrolisado
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CONAB	Companhia Brasileira de Abastecimento
DNS	Reagente Ácido Dinitrosalicílico
HCl	Ácido Clorídrico
HMF	Hidroxil Metil Furfural
LNF	Lactostab
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
NOx	óxidos de Nitrogênio
SESCB	Bagaço De Cana-De-Açúcar Explodido A Vapor
TAGs	Triacilgliceróis
T. SG2	Trichoderma. SG2
TRS	Açúcar Redutor Total
VFAs	Ácidos Graxos voláteis

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 HIPÓTESES.....	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
4.2 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS.....	19
4.2.1 Lignina.....	21
4.2.2 Hemicelulose.....	21
4.2.3 Celulose .....	22
4.3 PROCESSOS DE CONVERSÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS EM AÇÚCARES FERMENTÁVEIS .....	23
4.3.1 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos .....	23
4.3.2 Hidrólise .....	25
4.4 ÓLEOS E GORDURAS.....	28
4.5 LIPÍDEO MICROBIANO.....	30
4.5.1 Efeitos do pré-tratamento da oleaginosa biomassa na extração de lipídios.....	34
4.6 BIODIESEL.....	36
5 ARTIGO 1.....	42
6 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A- CROMATOGRAMA CG DA AMOSTRA DE BIODIESEL .....	79

## 1 Introdução

O crescente consumo de energia, decorrente do aumento da população, resultou na dependência excessiva de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), tendo como provável prognóstico a diminuição da oferta desses recursos. Além disso, o uso de combustíveis fósseis trouxe muitas preocupações ambientais, como o aquecimento global, devido à emissão de gases de efeito estufa. Neste contexto, alternativas renováveis de produção de energia devem ser exploradas para diminuir o impacto ambiental do uso de energias não renováveis, bem como reduzir a dependência de combustível fóssil (LEONG *et al.*, 2018).

Por isso, os biocombustíveis, em especial o biodiesel, aparecem como uma alternativa promissoras para substituir total ou parcial os combustíveis de origem fóssil, principalmente para o setor de transportes que é um dos setores onde há maior consumo de energia (FOTEINIS *et al.*, 2020).

O biodiesel é atualmente produzido pela transesterificação de óleo de cozinha usado, gordura animal e principalmente a partir de óleos vegetais. Entretanto, a competição com o uso alimentar dos óleos e as limitações no suprimento de óleos, derivados de plantas, torna-se necessário explorar o desenvolvimento de biodiesel de segunda geração, produzidos partir biomassa vegetal lignocelulósica que podem ser resíduos de madeira, resíduos florestais e agrícolas, lixo municipal e plantações de energia especial, reduzindo assim a competição entre a agricultura e a bioenergia (GALAFASSI *et al.*, 2012; WANG; HART; AN, 2019).

A recalcitrância das biomassas lignocelulósicas é uma das principais barreiras para a produção econômica de biocombustíveis. A celulose, hemicelulose e lignina, são os principais componentes dos materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento é pré-requisito para converter materiais lignocelulósicos em combustíveis. Os principais objetivos do pré-tratamento são separar os componentes dos materiais lignocelulósicos, remover a lignina, reduzir a cristalinidade, tornar os carboidratos (celulose e hemicelulose) mais acessível às enzimas hidrolíticas para conversão em açúcares (BALAT, 2011; ŁUKAJTIS *et al.*, 2018; YOUSUF, 2012). O processo de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses (HALDAR; PURKAIT, 2020).

Os resíduos agroindustriais são utilizados como substrato econômico para produção de enzimas. As enzimas hidrolíticas tem a função de degradar as cadeias

poliméricas da celulose e hemicelulose, convertendo-as em açúcares. Estas enzimas são geralmente produzidas por microrganismos como fungos e bactérias. (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Diferentes bactérias produzem celulase e xilanase. Fungos celulolíticos aeróbios, tais como o *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) ou *Humicola*, são atualmente utilizados para a produção industrial de celulase. No entanto, muitas dessas enzimas apresentam alto custo de produção. Conseqüentemente, as celulases rentáveis e de alta eficiência deve ser desenvolvidas. *Trichoderma* tem potencial para produzir enzimas celulolítica de alta  $\beta$ -glucosidase com potencial para a produção comercial de misturas de enzimas completas para a sacarificação de biomassa (OKEKE, 2014; ZHAO *et al.*, 2013).

Os hidrolisados lignocelulósicos podem ser utilizados por microrganismos oleaginosos (leveduras, fungos e algas) para produzir lipídios, alguns são capazes de acumular até 70% do peso seco total da célula sob condições apropriadas, usando açúcares celulósicos como fonte de carbono. Os triacilgliceróis (TAGs) contendo ácidos graxos de cadeia longa são a principal forma de ácidos graxos encontrados nesses lipídios, que também são comparáveis aos óleos vegetais convencionais usados para a produção de biodiesel (GALAFASSI *et al.*, 2012; JIRU *et al.*, 2017; KARATAY; DÖNMEZ, 2010).

A safra Brasileira de 2020/2021 foram colhidos 654 milhões de toneladas, sendo 45,9% destinada à produção de açúcar e 54,1% para etanol (CONAB, 2021). A produção do açúcar e etanol 1G gera-se como subproduto o bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico mais abundantes que, após hidrolisado, resulta em um mosco rico em xilose que pode ser potencialmente utilizado para a biossíntese de lipídios (BRAR *et al.*, 2017). Contudo, a geração de bioenergias de segunda e terceira geração são importantes para a economia, uma vez que tem grande potencial e ainda são pouco utilizados em grande escala. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a hidrólise do *bagaço de cana-de-açúcar* por enzima Celulolítico e xilanolítico produzidas por *Trichoderma SG2* (US Patent 9,617,574 B2), e produção de bioóleo pela levedura *Rhodotorula espécies R1* para posterior transformação em ésteres metal de ácidos graxos (Biodiesel).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a hidrólise de resíduos lignocelulósicos (*bagaço de cana-de-açúcar*) por enzimas Celulases, xilanases produzida pela *Trichoderma SG2* e utilizar o hidrolisado para produção de lipídio celular por uma levedura oleaginosa *Rhodotorula* espécie R1.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tradado por explosão de vapor, utilizando enzimas celulases e xilanases produzida pela *Trichoderma SG2* e uma combinação de enzima produzida pelo fungo *Trichoderma SG2* suplementado com Cellic CTec2;
- Avaliar a influência da carga de sólidos (10 e 15% de bagaço) no processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tradado por explosão de vapor;
  - Avaliar a taxa de hidrólise utilizando enzima bruta de *Trichoderma SG2* diluída em 50%;
  - Avaliar a eficiência da hidrólise da celulose em três-estágios com adição de nova enzima não diluída;
  - Utilizar uma levedura oleaginosa para bioconversão de açúcares do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tradado por explosão de vapor;
  - Estimar a produção de lipídeo celular produzida pela levedura oleaginosa a partir do hidrolisado de cana-de-açúcar com diferentes dosagens de suplementação de glucose (0g, 1,5g e 6g de glucose);
- Avaliar o perfil de ácidos graxos do biodiesel por cromatografia gasosa;

### **3 Hipóteses**

A enzima produzida por *Trichoderma* SG2 apresenta em sua composição celulasas que são degradantes de celulose

O lipídeo de *Rhodotorula* espécie R1 possui composição similar aos óleos vegetais e gordura animal

A Biomassa lignocelulósica possui potencial de geração de energia

## 4 Revisão bibliográfica

### 4.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é planta semi-perene, pertence à família de Gramineae (*Poaceae*), originária do sudeste Asiático na grande região central da Nova Guiné e Indonésia. A variedade do gênero *Saccharum* ssp. É um híbrido do cruzamento entre quatro espécies de cultivares e duas selvagens (*S. spontaneum* Linnaeus & *S. robustum* Brandes & *Jeswitex* Grassl & *S. officinarum* Linnaeus & *S. barberi* Jeswit & *S. sinensis* Roxb. & *S. edule* Hassk), altamente produtivas, adaptadas a ambientes diversos e resistente a doenças, permitiram a expansão da cultura pelo mundo (MORAIS *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2017).

A cana-de-açúcar possivelmente é a biomassa vegetal produzida em maior quantidade no mundo. O Brasil é líder na produção mundial de cana-de-açúcar, colheu na safra 2020/2021, mais de 654 milhões de toneladas de colmos e estima para safra 2021/2022 uma produção aproximada de 568 milhões de toneladas. A estimativa, sinaliza uma redução de 13,2% em comparação ao volume produzido em 2020/21. A estimativa de produção da safra 2021/2022, considera os efeitos climáticas como a estiagem durante o ciclo produtivo das lavouras e as baixas temperaturas registradas em junho e julho deste ano, inclusive com episódios de geadas em algumas áreas de produção (CONAB, 2021).

A cultura de cana-de-açúcar é sem dúvida muito importante, devido à sua imensa contribuição para a economia. A partir da cana-de-açúcar são produzidos, açúcar, etanol, melão, bebidas, extração de princípios ativos para cosméticos e do etanol é produzido diferentes plásticos verdes. A partir dos resíduos como: vinhaça, (subproduto da fabricação de etanol) é usado para a produção biogás/biometano, ração animal, produção de proteínas (biomassa) e fertilizantes; palha e bagaço, é gerado energia (bioeletricidade, etanol ou biodiesel lignocelulósico), ração animal, e papel; torta de filtro (resíduo da filtração mecânica do lodo na fabricação do açúcar e álcool) é utilizada como fertilizante, rica fonte de fósforo; Óleo fúsel é matéria-prima para processamento de refinação, de onde se extraem álcoois com diversos graus de pureza e para obtenção de outras substâncias químicas, como, por exemplo, solventes (MEGHANA; SHASTRI, 2020).

Devido a sua flexibilidade de aplicação, a cana-de-açúcar subdivide em dois grupos com diferentes conteúdos de fibras e açúcares. O Tipo I ou cana-de-açúcar



comercial apresenta maior proporção de sacarose em relação à fibra apresenta viabilidade para produção de biomassa para sólido, biomassa para líquido e biomassa para combustível gasoso, álcool, açúcar, bebidas, refrigerantes, silagem hidrolisada e forragens de alta qualidade. O tipo II ou cana-energética tem menor proporção de sacarose para fibra, então é utilizada para produção de lignocelulose de baixa umidade adequada para cogeração de calor e eletricidade (MOREIRA *et al.*, 2019) e favorecendo a produção de biocombustível a partir do bagaço, o chamado biocombustíveis lignocelulósicos.

Os principais fatores relacionados à qualidade da cana-de-açúcar são POL (sacarose aparente), pureza, açúcares redutores totais, teor de açúcares redutores, percentagem de fibra, tempo de queima e corte. A glicose e frutose compõem o grupo dos açúcares redutores. Já os açúcares redutores totais é o somatório da glicose, frutose e sacarose que compõem o caldo de cana, ou seja, a quantidade útil de açúcares contida no caldo extraído da cana e que é efetivamente aproveitado pela indústria para fabricação de açúcar ou etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2016; MAT *et al.*, 2014).

Segundo a CONAB (2021), na safra 2020/2021 de cana-de-açúcar foram obtidos de açúcares redutores totais 94,2 milhões de toneladas, a partir total de açúcares redutores totais foram produzidos aproximadamente 41 milhões de toneladas de açúcar e 30 bilhões de litros de etanol total (anidro e hidratado).

A quantidade e qualidade dos açúcares redutores totais são influenciadas pelo clima, a idade das lavouras e a forma de colheita. A colheita mecanizada ocorre, na maior parte das vezes, sem o uso da prática de queima das lavouras. Com isso, uma maior quantidade de impurezas vegetais, como palhas, vai para o processo de moagem e acaba por reduzir a eficiência na extração dos açúcares redutores totais. Além disso, as palhas criam um microclima favorável ao aparecimento de pragas e doenças, que prejudicam o açúcar redutor total (CONAB, 2021). Além desses, o processo industrial também influencia na constituição das frações de cana-de-açúcar, apresentado na Figura 1.

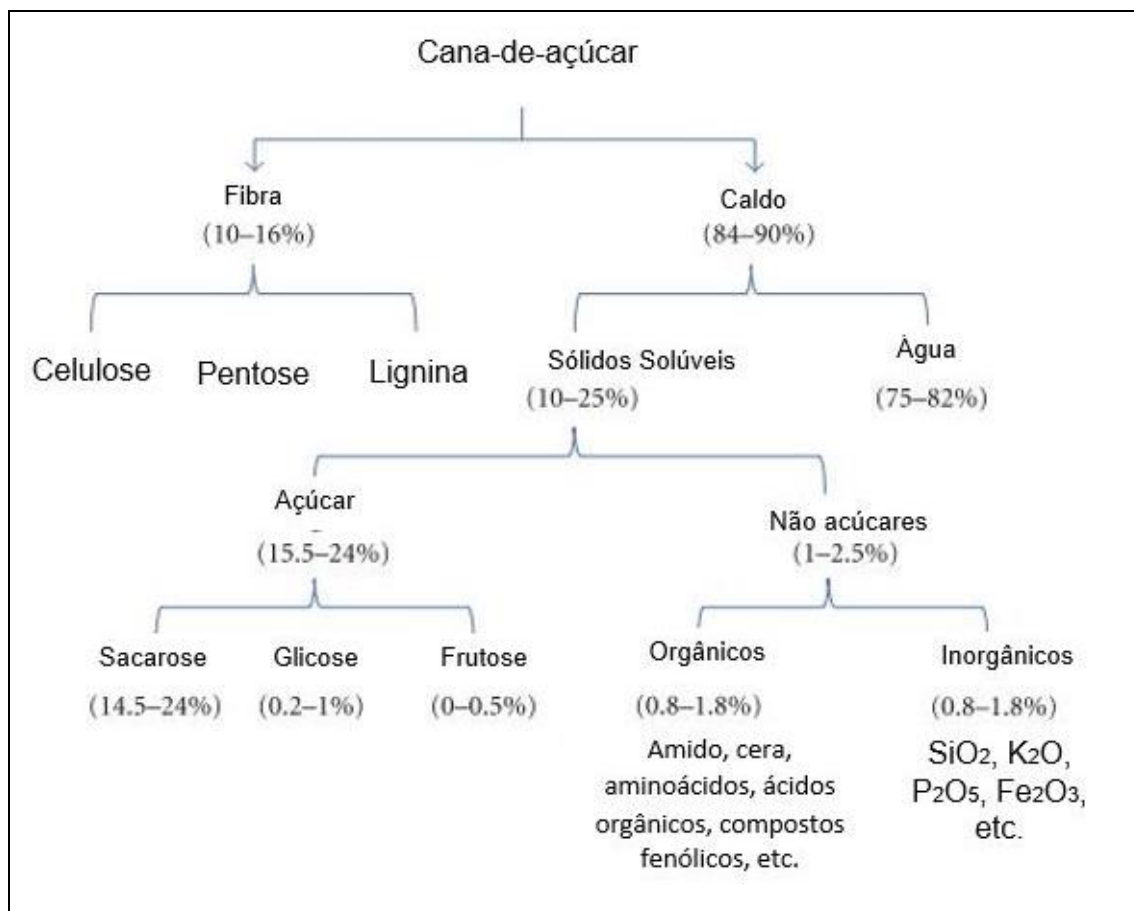


Figura 1 - Composição da cana-de-açúcar.  
Fonte: Canilha *et al.*, 2012

A quantidade de bagaço é determinada principalmente pelo teor de fibra da cana que está sendo processada. Por isso, a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar variar conforme a categoria de cana (tipo I e tipo II). Assim, 1 tonelada de cana-de-açúcar processada gera de 220 a 350 kg de bagaço (base úmida) (SOCCOL *et al.*, 2010; REIN, 2007) e 140 kg de palha (CANILHA *et al.*, 2012). A composição química do bagaço e da palha são apresentados na Tabela 1

Tabela 1 - Composição química da palha e bagaço de cana-de-açúcar

	Palha <sup>a</sup>	Bagaço (tipo I) <sup>b</sup>	Bagaço (tipoll) <sup>b</sup>
	%		
Celulose	44,26 ± 1,35	41,6	43,3
Hemicelulose	31,10 ± 0,78	25,1	23,8
Lignina	19,01 ± 1,95	20,3	21,7
Cinzas	4,86 ± 1,10	4,8	0,8
Extrativos	16,68 ± 2,83	-	-
Fibras	-	13,5	26,7

Fonte: <sup>a</sup>Santos *et al.*, 2014 e <sup>b</sup>Kim; Day, 2011

## 4.2 Biomassas lignocelulósicas

A biomassa lignocelulósica é considerada a fonte mais promissora de energia renovável, visto que a lignocelulose é a fonte de carbono mais abundante do planeta. O material lignocelulósico é um composto derivado da parede das células das plantas, composto em sua maioria de celulose (40% a 50%), hemicelulose (25% a 30%) e lignina (15% a 20%) e outros componentes extraíveis. O conjunto permanece coeso por ligações covalentes, formando uma estrutura chamada microfibrilas de celulose (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2018)

As fibrilas celulósicas encontram-se organizadas em espirais, de modo a conferir força e flexibilidade ao material. A celulose encontra-se envolvida pela lignina, de forma a conferir resistência a estrutura, contra desgaste mecânico e a ataques microbianos ou enzimáticos. Já a hemicelulose, atua como um agente de ligação químico entre a celulose e a lignina. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém recalcitrantes a decomposição e sacarificação (FERREIRA, 2010). A Figura 2 apresenta a estrutura da biomassa lignocelulósica.

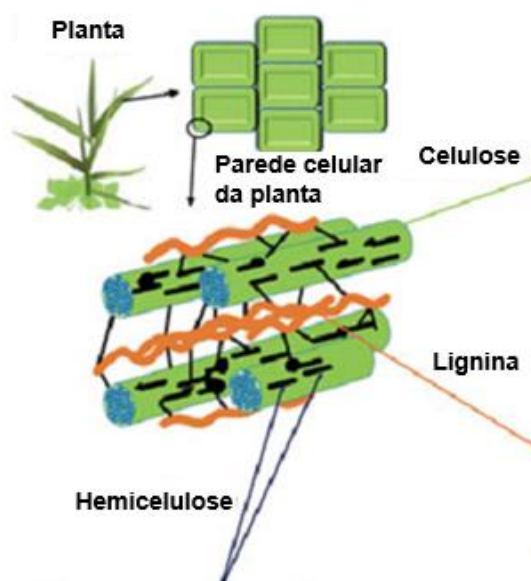


Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.  
Fonte: ZHOU et al., 2018

No entanto, a proporção da lignina, hemicelulose e celulose variam dependendo da espécie da planta, estágio de crescimento, da região de cultivo e variabilidade climática (ROBAK; BALCEREK, 2018). A Tabela 2 apresenta a composição bioquímica das biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2 – Composição Bioquímica das Biomassas Lignocelulósicas.

Material	Componente (%) em massa seca			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Alga (verde)	20-40	20-50	-	-
Algodão, linho	80-95	5-20	-	-
Gramineas	25-40	25-50	10-30	-
Madeira dura	45±2	30±5	20±4	0,6±0,2
Casca de madeira dura	22-40	20-38	30-55	0,8±0,2
Madeira macia	42±2	27±2	28±3	0,5±1
Casca de madeira macia	18-38	15-33	30-60	0,8±2
Talo milho	39-47	26-31	3-5	12-16
Palha de milho	38-40	28	7-21	3,6-7
Palha de trigo	33-41	26-32	13-19	6-14
Jornal	40-55	25-40	18-30	-
Poupa de celulose	60-80	20-30	2-10	-
Talo de sorgo	27	25	11	-
Palha de sorgo	32	24	13	12
Bagaço de sorgo sacarino	34-45	18-28	14-22	-
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45	2,7-10,2
Bagaço	32-48	19-24	23-32	1,5-5
Palha de arroz	28-36	23-28	12-14	14-20
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19	2-7

Fonte: adaptado de Saini; Saini; Tewari, 2015

### 4.2.1 Lignina

É um biopolímero aromático tridimensional amorfo de estrutura rígida, encontrada na parede celular vegetal. A lignina é composta por três monômeros fenólicos (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) depositados durante a maturação da parede celular (Figura 3). Estas unidades fazem ligações cruzadas com os polissacarídeos da parede celular auxiliando no seu empacotamento (ROBAK; BALCEREK, 2018).

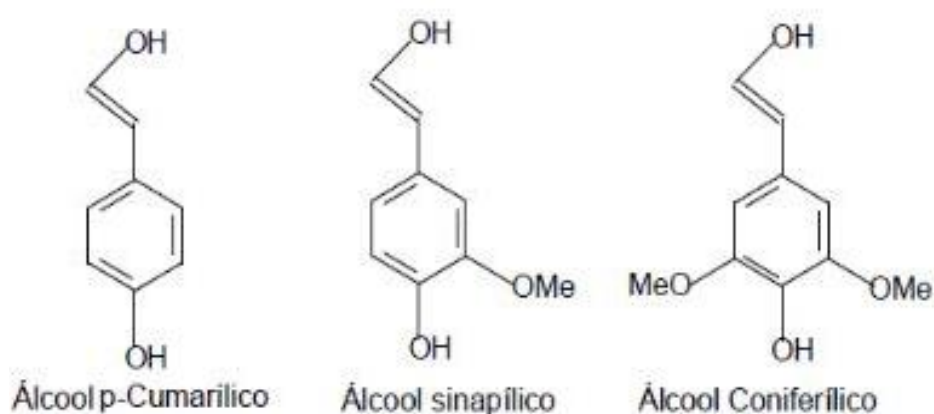


Figura 3 - Constituintes fenólicos da lignina.  
Fonte: ZHOU et al., 2018.

A lignina constitui-se em uma estrutura hidrofóbica responsável pela prevenção do ataque à parede celular das plantas por microrganismos Celulolíticos, e assim proporcionando a biomassa lignocelulósica maior integridade estrutural (SILVA, 2018).

### 4.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose consiste em vários monossacarídeos polimerizados, incluindo hexoses (D-glicose, D-galactose e manose), bem como pentoses (D-xilose e arabinose) e pode conter ácidos de açúcar (ácidos hexurônicos), como  $\beta$ -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e  $\beta$ -D-galacturônico. A cadeia principal da hemicelulose contém principalmente xilose, aproximadamente 90% e 10% de L-arabinose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (LIMAYEM; RICKE, 2012; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). A

Figura 4 ilustra a estrutura da hemicelulose, na qual a cadeia linear representa a xilana.

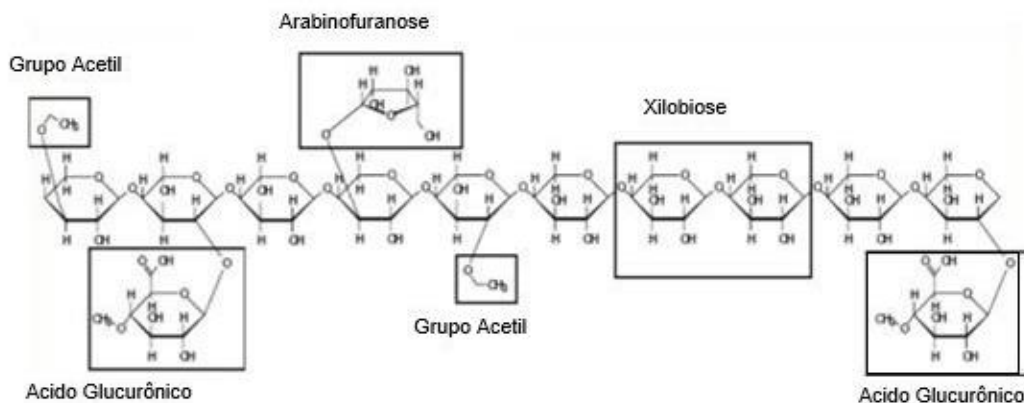


Figura 4 - Representação da estrutura da hemicelulose.

Fonte: FERREIRA, 2010

#### 4.2.3 Celulose

A celulose é o polímero orgânico mais abundante do planeta e o maior componente da biomassa vegetal. Pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, mas é comumente encontrada associada a hemicelulose e lignina na parede celular. A celulose é um polímero linear com alto grau de polimerização (DP) que contém até 15.000 unidades de β-D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β-(1-4). As cadeias de celulose agregam-se formando microfibrilas de celulose e as hidroxila são responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio intra e intercadeias, que consistem em regiões cristalinas intersectadas por regiões amorfas (ANU *et al.*, 2020; LYND *et al.*, 2002; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Os resíduos de β-D-glicose nas regiões cristalinas da microfibrila de celulose são anidros; isso ocorre porque a orientação dos três grupos hidroxila livres do açúcar cria fortes ligações moleculares com moléculas de glicose em cadeias adjacentes, que tornam a celulose insolúvel em água. A interligação da celulose pelas forças de van der Waal e ligações de hidrogênio leva à formação de microfibrilas de alta resistência à tração. Essas microfibrilas também se ligam umas às outras através da hemicelulose ou / e pectina com cobertura de lignina, que fornece resistência à celulose contra vários ataques químicos e biológicos (ANU *et al.*, 2020; MAFA; PLETSCHE; MALGAS, 2021).

Na figura 5 é apresentado uma cadeia de celulose direcional, pois consiste em uma glicose de extremidade redutora que contém um carbono anomérico (C1) e uma glicose de extremidade não redutora, consistindo de hidrogênio e um grupo hidroxila no carbono C4 (MAFA; PLETSCHKE; MALGAS, 2021).

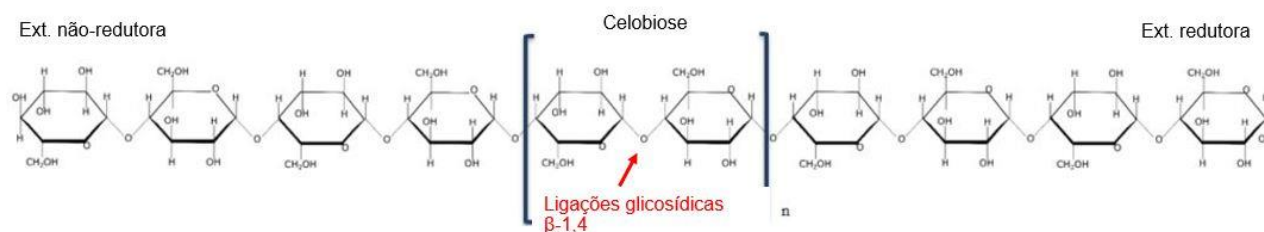


Figura 5 - Estrutura da celobiose e da ligação  $\beta$ -glicosídica na celulose.  
Fonte: Adaptado de Mafa; Pletschke; Malgas, 2021

### 4.3 Processos de conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis

Um dos principais obstáculos envolvidos no processo de produção de etanol de segunda geração é desestruturar a lignina da biomassa, liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis, de forma eficiente e economicamente viável (SANTOS *et al.*, 2012). Para superar essas limitações, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, que remova a estrutura recalcitrante da lignina que reduza a cristalinidade da celulose, bem como uma etapa de hidrólise, que transforme os oligômeros e dímeros em monômeros de glicose. Desta forma, pode-se dizer que, a obtenção biocombustíveis (por rota bioquímica) a partir de biomassa lignocelulósica envolve duas etapas adicionais em relação ao processo de produção de etanol de primeira geração: o pré-tratamento e a hidrólise.

#### 4.3.1 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A suscetibilidade da biomassa (celulose e hemicelulose) à hidrólise enzimática é dependente de um processo eficiente de pré-tratamento. A finalidade do pré-tratamento é aumentar a porosidade da biomassa, diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose ao separar a hemicelulose da lignina. Além disso, um pré-tratamento eficiente deve aumentar a formação de açúcar, reduzir a degradação de carboidratos, evitar a formação de subprodutos inibitórios e ser viável do ponto de vista econômico (ANU *et al.*, 2020; BALAT, 2011; HALDAR;

PURKAIT, 2020). Vários métodos podem ser utilizados dependendo da condição de reação ideal para cada um dos materiais (Figura 6).



Figura 6 - Diagrama com diferentes métodos de pré- tratamento de materiais lignocelulósicos. Fonte: Ferreira, 2016.

Vários métodos de pré-tratamento são investigados para biorecursos lignocelulósicos, a explosão a vapor tem-se mostrado eficaz para diferentes materiais. O pré-tratamento de explosão a vapor pode ser realizada na presença ou ausência de um catalisador ácido e ainda posteriormente a explosão pode-se aplicar um processo de deslignificação (LUCAS *et al.*, 2021; HAN *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2018).

A explosão de vapor também é conhecida como auto-hidrólise, atua química e fisicamente na estrutura do material lignocelulósico. O processo de explosão a vapor é baseado em colocar a biomassa em contato com um vapor saturado à alta pressão (1 à 5Mpa), e alta temperatura (150 à 300°C) por um curto espaço de tempo, seguido de descompressão rápida à condição atmosférica (explosão). O processo provoca o rompimento da estrutura do material e hidrolisa a hemicelulose pela presença de ácidos orgânicos, como ácidos acéticos e outros ácidos formados a partir de acetila ou outros grupos funcionais liberados da biomassa e transformação da lignina devido à alta temperatura, facilitando assim a subsequente hidrólise da celulose (HALDAR; PURKAIT, 2020; NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016).



No entanto, o processo de explosão de vapor gera inibidores como ácidos orgânicos, furfural ou fenóis, inibindo os microrganismos fermentadores ou enzimas degradantes da celulose. Assim, a condição ideal precisa ser rastreada e uma estratégia de desintoxicação adequada pode ser necessária, como extração alcalina (HE *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2017).

He *et al.* (2019), relataram os resultados do pré-tratamento da *hippophae* por explosão a vapor em três condições: explosão a vapor (1Mpa durante 10 e 30 minutos; 1,5Mpa de 5 à 30min), explosão a vapor com 65% de umidade (hidratação com CaO a 2%) e explosão a vapor consecutivas (1,5Mpa por 5min). A medida que aumentou o tempo de permanência do material no reator, aumentou o teor de umidade. A máxima solubilização da hemicelulose, sem hidratação foi de 77,16%, com hidratação foi de 34,65% (hemicelulose encontrada no substrato pós explosão foi de 13,22% de um total de 20,23%) e duas explosões a vapor consecutivas hidrolisou 68,21% (pós-explosão no substrato obteve 6,43% de hemicelulose).

No trabalho Lucas *et al.* (2021), o *bagaço de cana-de-açúcar* foi submetido a explosão a vapor em um Reator de 5000L durante 7min a 200° C. O bagaço de cana pré-tratado tem como composição 58,4% de celulose e 34,3% de lignina e a maior parte da hemicelulose foi solubilizada resultando um residual na massa sólida um percentual de 8,9% de um total no material *in natura* era de 25,8%. O processo de deslignificação em bagaço de cana pré-tratado aumentou o teor de celulose de 43,8% para 90%, consequentemente reduzindo os teores de hemicelulose para 3,5% e lignina 5,5% de 22,1%.

#### **4.3.2 Hidrólise**

Subsequentemente ao pré-tratamento, é necessário um processo de hidrólise da celulose e hemicelulose, com a finalidade de degradar as cadeias poliméricas em unidades menores de açúcares fermentáveis (glicose, xilose). Esta é uma etapa crítica para a produção de biocombustíveis (SARKAR *et al.*, 2012).

A conversão em açúcares fermentescíveis pode ser realizada por duas rotas: hidrólise com ácido concentrado ou diluído e enzimática, em ambos os casos, a redução física do material é necessária de modo a aumentar a área superficial. Existem alguns outros métodos de hidrólise como hidrólise por radiação gama ou

por feixe de elétrons, ou irradiação de micro-ondas, porém ainda não está disponível comercialmente (BALAT, 2011).

A hidrólise ácida (ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e principalmente ácido sulfúrico) é considerado um dos mais importantes técnicas para obter altos rendimentos de açúcares de lignocelulósicos. Embora sejam agentes poderosos para a hidrólise da celulose, os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos e requerem reatores resistentes à corrosão. Já a hidrólise com ácidos diluídos são utilizadas condições menos severas, e alcançam altos rendimentos de conversão de xilano em xilose. Porém, a neutralização do pH é necessária para processos a jusantes como hidrólise enzimática ou processos de fermentação, e ainda resulta na produção de vários inibidores como ácido acético, furfural e 5 hidroximetilfurfural. Esses produtos são inibidores do crescimento de microrganismos, usados para fermentação, portanto, precisam ser desintoxicados (SARKAR *et al.*, 2012; SUN; CHENG, 2002).

Em relação à hidrólise ácida, a hidrólise enzimática requer menos energia e condições ambientais mais brandas (a temperatura de 50-60° C com pH 4,8-5,0) e alta recuperação de açúcar sem formação de inibidor (BALAT, 2011). No entanto, devido à natureza complexa da biomassa lignocelulósica, uma única enzima não promove a hidrólise completa da biomassa. É necessária uma ação sequencial de uma série de enzimas. As principais enzimas envolvidas na hidrólise da celulose e hemicelulose são descritas abaixo:

- Celulases

As celulases são o grupo de enzimas usadas para degradar a celulose por meio da clivagem da ligação glicosídica  $\beta$ 1–4. As celulases são classificadas conforme o local de ação. Exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia de celulose, onde se encontram as extremidades reductores e não reductores, assim liberando a celobiose. Endoglucanase cliva aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\beta$ 1–4 resultando na produção de novas extremidades de celobiose e unidades de celotriose. A  $\beta$ -glucosidase ataca as unidades de celobiose para formar açúcar simples (glicose) (SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020). As enzimas celulases são produzidas por vários microrganismos, tais como,

O *isolado de Fusarium solani* demonstrou 12,09Umg<sup>-1</sup> de atividade de Exoglucanase, 0,31Umg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucosidase e 7,35Umg<sup>-1</sup> de endoglucanase usando glicose e tempo de fermentação de 84h (MARTÍNEZ-PACHECO *et al.*, 2020).

O isolado *Humicola grisea* var. *Thermoidea* foi encontrado valores para celulasas em celobiohidrolases/ Exoglucanases ( $0,195\text{UmL}^{-1}$  após 24 h em 3% farelo de trigo), endoglucanases ( $3,54\text{UmL}^{-1}$  após 240 h em 3% bagaço de cana-de-açúcar) e Fpases/celulase ( $0,174\text{UmL}^{-1}$  após 240 h em 3% farelo de trigo) (FARIA et al., 2020).

O fungo *Trichoderma asperellum* UC1 sob fermentação em estado sólido de folhas de palmeira de óleo crua em condições ideais de fermentação ( $30^{\circ}\text{C}$ , 60-80% de teor de umidade,  $2,5 \times 10^6$  esporos $\text{g}^{-1}$  de tamanho do inóculo) a atividade máxima de CMCase/ Endoglucanase foi de  $136,16\text{Uig}^{-1}$ , Fpase/celulose de  $26,03\text{Ug}^{-1}$  e  $\beta$ -glicosidase de  $130,09\text{IUg}^{-1}$  (EZEILO et al., 2019).

- Xilanases

A hemicelulose é segundo componente mais abundante das biomassas lignocelulosicas. É um polímero heterogêneo complexo; composto principalmente de pentose, como xilose e arabinose. Existem várias enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose. A maioria deles são hidrolíticos e atuam sinergicamente na degradação da xilana e com as enzimas degradantes da celulose. As enzimas xinalolíticas mais importantes são endo- $\beta$ -1,4-xilanase ( $\beta$ -1,4-D-xilano xilano-hidrolase), que cliva as ligações glicosídicas para produzir xilo-oligossacarídeos e  $\beta$ -1,4-xilosidase ( $\beta$ -1,4-D-xilosídeo xilo-hidrolase), responsável pela quebra final dos xilo-oligossacarídeos em D-xilose (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020; FARIA et al., 2019). As xilanases são geralmente isoladas de fungos, pois esses microrganismos secretam extracelularmente grandes quantidades dessas enzimas (EZEILO et al., 2019).

Uma co-cultura usando *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* apresentou para atividade de xinalase demonstrou um valor de 505 IU/g-ds (Unidades Internacionais/grama de substrato seco), utilizando como substrato casca de soja e o farelo de trigo na proporção de 4:1 e temperatura de fermentação de  $30^{\circ}\text{C}$  e tempo máximo de fermentação 120h (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010)

A *Humicola grisea* var. *Thermoidea* apresentou atividade de endoxilanases ( $23,75\text{UmL}^{-1}$  após 144 h em 3% de farelo de trigo),  $\beta$ -xilosidases ( $0,18\text{UmL}^{-1}$  após 120 h em 3% de bagaço de cana-de-açúcar) e arabinofuranosidases ( $0,17\text{UmL}^{-1}$  após 24 h em 3% farelo de trigo) (FARIA et al., 2020).

O isolado de *Trichoderma asperellum* UC1 sob fermentação em estado sólido de folhas de palmeira de óleo crua em condições ideais de fermentação ( $30^{\circ}\text{C}$ , 60-

80% de teor de umidade,  $2,5 \times 10^6$  esporos $g^{-1}$  de tamanho do inóculo) a atividade máxima de xilanase foi registrada em  $255,01 U g^{-1}$  (EZEILO *et al.*, 2019).

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é afetada por diversos fatores como: concentração da enzima e substrato, adsorção da enzima na lignina, sinergismo, inibição do produto final, desativação mecânica e também inativação térmica (BINOD *et al.*, 2019).

A concentração de substrato afeta o rendimento e a taxa inicial de hidrólise enzimática da celulose. Altas taxas de substrato normalmente resulta em um aumento no rendimento da reação da hidrólise. No entanto, a alta concentração de sólidos pode causar a inibição da hidrólise, pois a razão taxa de sólidos é diretamente proporcional a dosagem de enzima (SUN; CHENG, 2002).

A temperatura desempenha um papel crítico na adsorção da celulase. Normalmente as celulasas funcionam melhor em temperaturas abaixo de  $60^\circ C$  e durante este período ocorre maior adsorção e sacarificação do substrato celulósico, o que não ocorre em temperaturas acima de  $60^\circ C$  (BINOD *et al.*, 2019).

A hidrólise é afeta pela ação de inibidores proveniente do processo de pré-tratamento, como ácidos orgânicos como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico, produtos de degradação de açúcar como furfural, 5-hidroximetil furfural (5-HMF), ácido urônico como ácido galacturônico, ácidos glucurônicos e 4-o-metil produtos de degradação de ácido glucurônico e lignina como vanilina, siringaldeído e 4-hidroxibenzaldeído (BINOD *et al.*, 2019).

Alguns fatores como a presença e o tipo de surfactantes (Não iônico, catiônico e iônico) pode atuar positivamente ou negativamente o processo de hidrólise. Os surfactantes não iônicos reduzem as interações lignina-enzima residual, melhorando o rendimento da hidrólise. O brometo de cetiltrimetilamônio (catiônico), pode promover a biodegradação de substratos lignocelulósicos específicos nas condições de reação apropriadas, porém outros surfactantes catiônicos podem inibir a atividade das celulasas (ZHENG; JIANG; YAO, 2021).

#### **4.4 Óleos e Gorduras**

Óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal e animal, que contêm aproximadamente 98% de triacilgliceróis (ésteres de ácidos graxos superiores e glicerol), mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, água, corantes, fosfolipídios e outros (HÁJEK *et al.*, 2021; KAYA *et al.*, 2009). Os ácidos graxos são compostos por

ácidos carboxílicos (-COOH) com cadeias carbônicas alifáticas abertas saturadas ou insaturadas (HEWAVITHARANA *et al.*, 2020). Os ácidos graxos saturados tendem a ser sólidos a temperatura ambiente por não possuírem duplas ligações. Já os ácidos graxos insaturados geralmente são líquidos a temperatura ambiente.

Os ácidos graxos diferem-se entre si pelo número de carbono presente em sua cadeia, pela presença de agrupamentos químicos e também pelo número e posição das duplas ligações. O número de carbono é uma propriedade importante, pois quanto maior a cadeia carbônica maior o grau de cetano, assim produz biodiesel com baixa emissão de óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) no escapamento de motores. Óleos e gorduras com baixo grau de cetano ou maior a instauração torna as moléculas menos estáveis quimicamente, podendo promover a oxidação, degradações e polimerização do combustível, originando menor número de cetano ou formação de resíduos sólidos (borras), caso seja armazenado ou transporte inadequadamente (ANSCHAU, 2014; GARCILASSO, 2014). A tabela 3 apresenta as porcentagens dos ácidos graxos comumente encontrados em óleos vegetais.

**Tabela 3 - Ácidos graxos saturados e insaturados comumente encontrados em óleos e gorduras**

Tipo de óleo	Ácido graxo (%)				
	Palmítico C16	Estearico C18	Oléico C18:1	Linoléico C18:2	Linolênico C18:3
Coco	9,26 ± 0,39	2,97 ± 0,23	7,24 ± 0,25	1,90 ± 0,14	ND
farelo de arroz	19,34 ± 0,85	2,0 ± 0,11	43,42 ± 1,25	32,04 ± 0,98	0,59 ± 0,14
Soja	11,67 ± 0,48	3,87 ± 0,82	24,77 ± 2,41	54,17 ± 1,72	5,16 ± 0,77
Girassol	6,43 ± 0,36	3,69 ± 0,22	25,92 ± 2,23	62,69 ± 2,20	ND
Algodão	23,40 ± 0,23	2,79 ± 0,12	17,82 ± 0,18	51,81 ± 0,66	0,35 ± 0,00

Fonte: adaptado de Dorni *et al.*, 2018.

Considerando-se a obtenção de biodiesel, o processo de produção a ser escolhido deve levar em conta o método mais adequado, que varia de acordo com a matéria-prima de origem (GARCILASSO, 2014).

#### 4.5 Lipídeo microbiano

Lipídeos microbianos são óleos ou gorduras produzidos por fermentação a partir de algas, fungos filamentosos e leveduras, contêm uma vasta gama de classes lipídicas, como acilglicerídeos (80-90% de TAGs), fosfolipídios, glicolipídios, lipoproteínas, ácidos graxos livres, esteróis, hidrocarbonetos e pigmentos. Os TAGs são formados três moléculas de ácidos graxos (AG) ligadas a uma molécula de glicerol por ligações éster. Esses ácidos graxos produzidos são semelhantes aos de óleos comestíveis produzidos por plantas. Isso significava que os ácidos graxos dos óleos extraídos poderiam ser usados como matéria-prima para a fabricação de biodiesel (DONG *et al.*, 2016; POONTAWEE; YONGMANITTHAI; LIMTONG, 2017). Na tabela 4 e 5, estão apresentados perfil graxo e o teor de lipídeo acumulado de alguns microrganismos oleaginosos.

Tabela 4 - Perfil graxo alguns microrganismos oleaginosos

Microrganismos	Substrato	Temperatura	Ácido graxo (%)					REf.
			Ácido mirístico (C14:0)	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido linoléico (C18:2)	
<i>Candida lipolytica</i>			–	21,6	27,1	19	12	Karatay; Dönmez, 2010
<i>Candida tropicalis</i>	Melaço	30°C	5,3	29,7	56,2	2,3	-	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			2,8	26,2	37,3	22,3	6,5	Poontawee; Yongmanitchai; Limtong, 2018
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i>	Bagaço de	25°C	1,6	34,5	11,5	32,1	16,6	
	cana-de-açúcar	28°C	1,9	33,7	9,2	33,6	18,3	
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	espiga de milho	30°C	2	32,9	8,4	34,8	18,7	
		26°C	16,7	24,4	2,9	46,8	6,5	Miao <i>et al.</i> , 2020

Os microrganismos oleaginosos são aqueles que tem capacidade de produzir e acumular uma grande quantidade de lipídeos em sua massa seca, ultrapassando 20%. Um desequilíbrio do metabolismo promove o acúmulo de lipídeos, promovido pela privação de nitrogênio ou outros nutrientes, como zinco, ferro, fósforo e magnésio. A resposta da célula ao esgotamento de um nutriente essencial inicia a fase de armazenamento de lipídios, na qual o excesso de carbono é convertido em lipídios e armazenados. No entanto, o recarregamento de nutrientes ou nitrogênio fazem com que as células passem a mobilizar as reservas de óleo e transformar em materiais celulares (MADANI; ENSHAEIEH; ABDOLI, 2017).

Tabela 5 - Produção de lipídeos por leveduras em substrato de melão

Leveduras	Conteúdo de lipídios (% peso celular seco)	
	48 horas	96 horas
<i>Candida utilis</i>	15,4 ± 1,2	17,4 ± 2,2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	20,4 ± 2,7	51,7 ± 4,4
<i>Schizosaccharomyces cerevisia</i>	16,1 ± 0,9	35,8 ± 2,5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	18,6 ± 1,8	9,8 ± 1,1
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	8,9 ± 1,3	27,5 ± 3,2
<i>Candida sp</i>	21 ± 1,4	22,8 ± 2,2
<i>Candida lambica</i>	34,8 ± 3,4	25,8 ± 3,0
<i>Candida lipolytica</i>	13,8 ± 1,5	37,1 ± 3,4
<i>Candida sp.</i>	36 ± 3,2	35,4 ± 3,7
<i>Candida tropicalis</i>	23,1 ± 2,6	41,2 ± 3,1
<i>Candida membranaefacien</i>	29,6 ± 3,3	20,7 ± 2,6

Fonte: adaptado de Karatay;Dönmez, 2010

As partículas lipídicas começam a se formar durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase estacionária, este processo continua até que a fonte de carbono no meio começa a declinar, ou seja, ocorre dois estágios de produção de



lipídeos, principalmente em meio com excesso de carbono. No primeiro estágio ocorre o crescimento celular que consome todo o nutriente do meio, exceto o carbono. Durante a segunda fase, a quantidade em excesso de carbono se transforma em reservas de lipídios. Devido à limitação de nitrogênio, as células não podem mais crescer e se multiplicar (MADANI; ENSHAEIEH; ABDOLI, 2017). A representação do processo de acúmulo de lipídeos em microrganismos oleaginosos está apresentado na Figura 7.

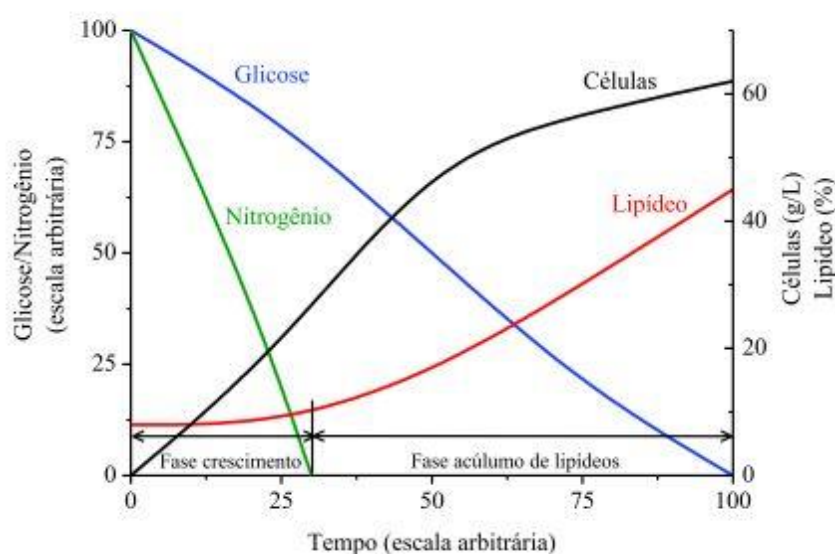


Figura 7 - Diagrama do crescimento celular e acúmulo de lipídeo por microrganismos oleaginosos. Fonte: ANSCHAU, 2014.

O sal de amônio é uma boa fonte de nitrogênio para a produção de lipídios. Tendo o nitrogênio como limitante promove a inibição do isocitrato desidrogenase, de modo que o citrato é acumulado no citoplasma e então transportado para a mitocôndria, onde é liberado pela ATP citrato liase e ocorre a formação de acetil coenzima A, que pode ser convertida em ácidos graxos. As fontes de nitrogênio inorgânico são adequadas para o crescimento celular, mas não para o acúmulo de lipídios, enquanto as fontes de nitrogênio orgânico, como peptona, são adequadas para o acúmulo de lipídios, mas não para o crescimento celular. Por isso, a relação C/N é o fator mais importante que afeta o acúmulo de lipídios (MADANI; ENSHAEIEH; ABDOLI, 2017).

No trabalho de Braunwald *et al.* (2013), produção de lipídeo com levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*, constatou que a variação de  $16,2\text{g/L}^{-1}$  (C/N 20c)

para  $57,0\text{gL}^{-1}$  (C/N 70) dobrou o rendimento da produção de lipídeo. No entanto, um aumento adicional para  $97,4\text{gL}^{-1}$  (C / N 120c) não levou a maiores rendimentos lipídicos. Geralmente, pode-se afirmar que a síntese de lipídios são estimuladas em razões C/N mais altas.

O perfil de ácidos graxos na matéria-prima de óleo pode determinar as propriedades do biodiesel, como fluxo frio, estabilidade oxidativa e valor iônico. De acordo com isso, avaliar a composição de ácidos graxos do óleo microbiano é muito importante. O perfil de ácidos graxos depende da espécie e pouco afetado pelo tipo de fonte de carbono do meio. O óleo microbiano pode ser convertido em biodiesel por diferentes catalisadores. A aplicação de óleo microbiano como matéria-prima de biodiesel exibe propriedades de combustível melhoradas, como maior número de octanas e menor viscosidade (MADANI; ENSHAEIEH; ABDOLI, 2017).

#### **4.5.1 Efeitos do pré-tratamento da oleaginosa biomassa na extração de lipídios**

Uma forma de pré-tratamento de biomassa, como ruptura celular, é geralmente necessário para remover ou enfraquecer as paredes celulares protetoras dos microrganismos para tornar os lipídios intracelulares mais acessíveis na extração por solvente (DONG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2021). Na figura 8, apresentado resumidamente varias técnicas aplicadas na oleaginosa biomassa que levam à lise celular e extração de lipídios.

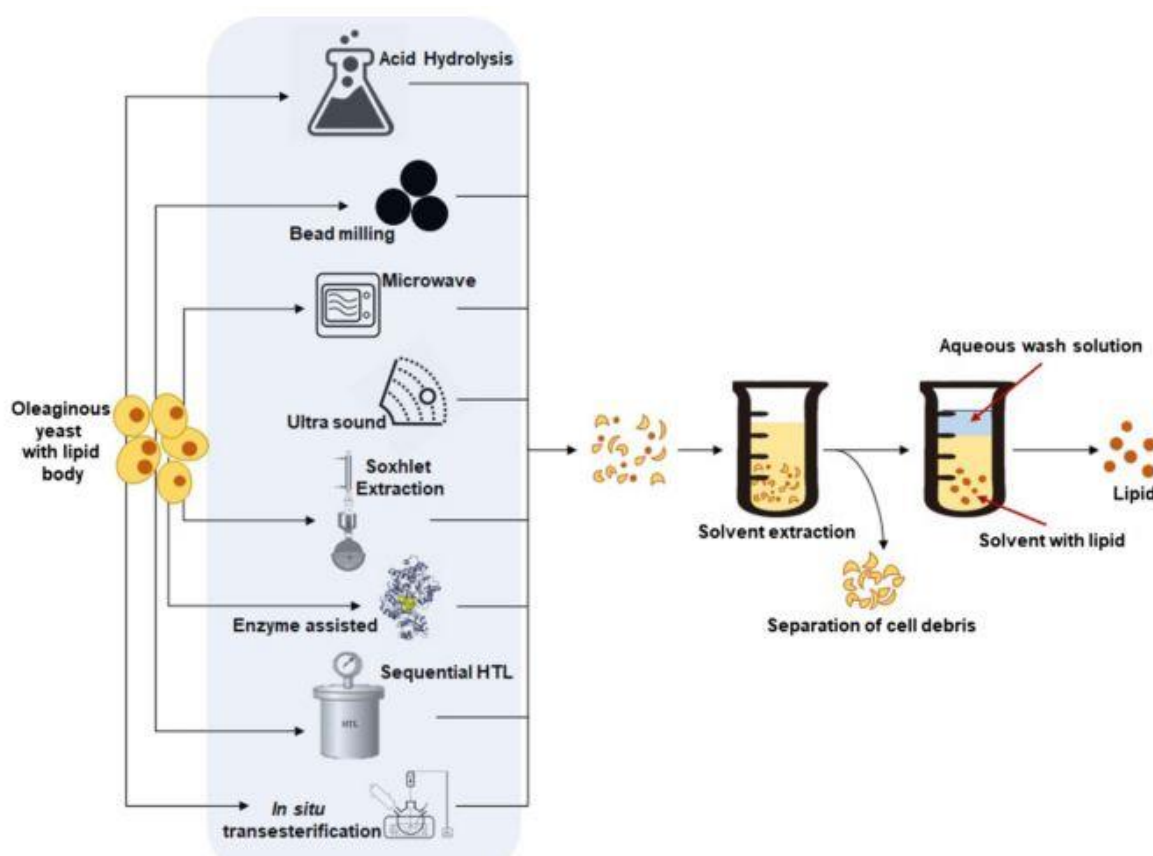


Figura 8 - Tecnologias de ruptura da parede celular.

Fonte: KHOT *et al.*, 2020

Yu *et al.* (2014), conduziu uma investigação comparativa usando várias espécies diferentes de leveduras oleaginosas, fungos e microalgas para relatar os rendimentos de recuperação de lipídios após vários métodos de ruptura celular. Eles concluíram que a hidrólise ácida antes da extração era o método mais simples e eficaz para extrair lipídios de micro-organismos oleaginosos em comparação com o batimento de esferas, micro-ondas, autoclavagem ou sonicação.

Sàncheznoqué *et al.* (2018) submeteu células de levedura a hidrólise ácida, em que 8% em peso de sólidos de levedura em água a 170°C por 60min com 1% em peso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após o tratamento com ácido, as pastas celulares lisadas foram extraídas com um volume igual de hexano, recuperados 90% dos lipídios de levedura cultivada em hidrolisado de palha de milho. Os autores, concluíram que a recuperação de lipídeo depende da espécie de levedura e do tipo de meio de cultivo. Os lipídios de *C. curvatus* foram facilmente extraíveis, com 93,7% recuperados, *R. Toruloides* foi de 43,9% e *T. guehoae* a recuperação foi de 38,0%.

No entanto, o tratamento com HCl não conseguiu obter lipídios de levedura em seu estado nativo, mas gera ácidos graxos livres pela hidrólise de fosfolipídios (KHOT *et al.*, 2020).

A presença de altos teores de ácidos graxos livres (AGL) e água em algumas matérias-primas, quando a reação for por catálise alcalina, ocorre a formação de sabão neutralizando os ácidos graxos livres e saponificando os triglicerídeos na presença de água residual. A formação de sabão leva ao consumo parcial do catalisador e reduz o rendimento do biodiesel. Portanto, a matéria-prima não deve conter mais de 1% de AGL para reações de transesterificação por catálise alcalina. Uma possibilidade é a reação de esterificação por catálise ácida, tendo como desvantagem a formação de água que limita a conclusão da reação (THLIVEROS; UÇKUN; WEBB, 2014).

#### 4.6 Biodisel

A matriz energética mundial é composta por 84% de fontes não renováveis, tais como petróleo, carvão e gás natural (MUFUTAU OPEYEMI, 2021). Na matriz brasileira as fontes de energias não renováveis correspondem a 54% (EPE, 2021a). Com o desenvolvimento econômico dinâmico do mundo tem contribuído para o aumento do consumo de energia que cresce a uma taxa de 2,4% ao ano (BÓRAWSKI *et al.*, 2019; SORRELL, 2015). Os setores de maior demanda de energia no Brasil são as industriais e transportes (Figura 9). Os combustíveis mais demandados para o setor de transporte são o diesel e a gasolina (BÓRAWSKI *et al.*, 2019; RIVERA-GONZÁLEZ *et al.*, 2020).

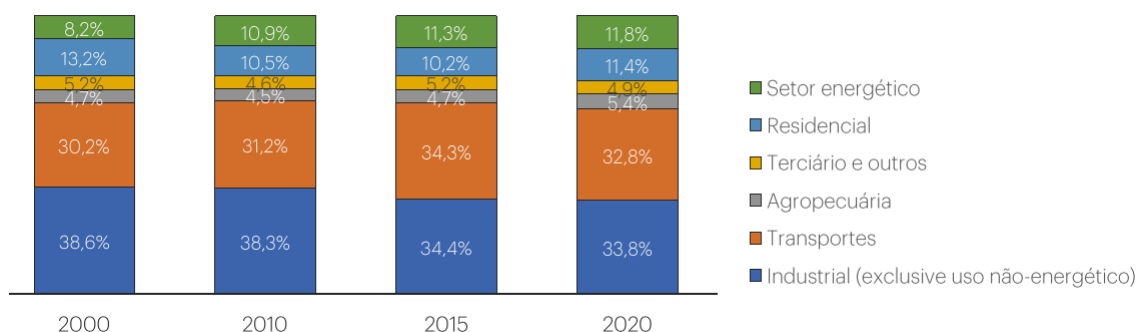


Figura 9. Evolução Brasileira de consumo de energia por setor

Fonte: EPE, 2021b

O consumo de energias não renováveis está se tornando insustentável, além de prejudiciais ao meio ambiente. Nesse cenário, surgem alternativas de energia renovável, mas sua exploração depende de alguns fatores, como sua disponibilidade. Ao instalar energias renováveis, há um grande potencial de redução significativa de emissões, além de economia de custos (TOZZI; JO, 2017; VIEIRA; NADALETI; SARTO, 2021). A América Latina é líder na produção de energias renováveis, sendo as principais energias produzidas a energia hídrica e biocombustíveis (Figura 10)

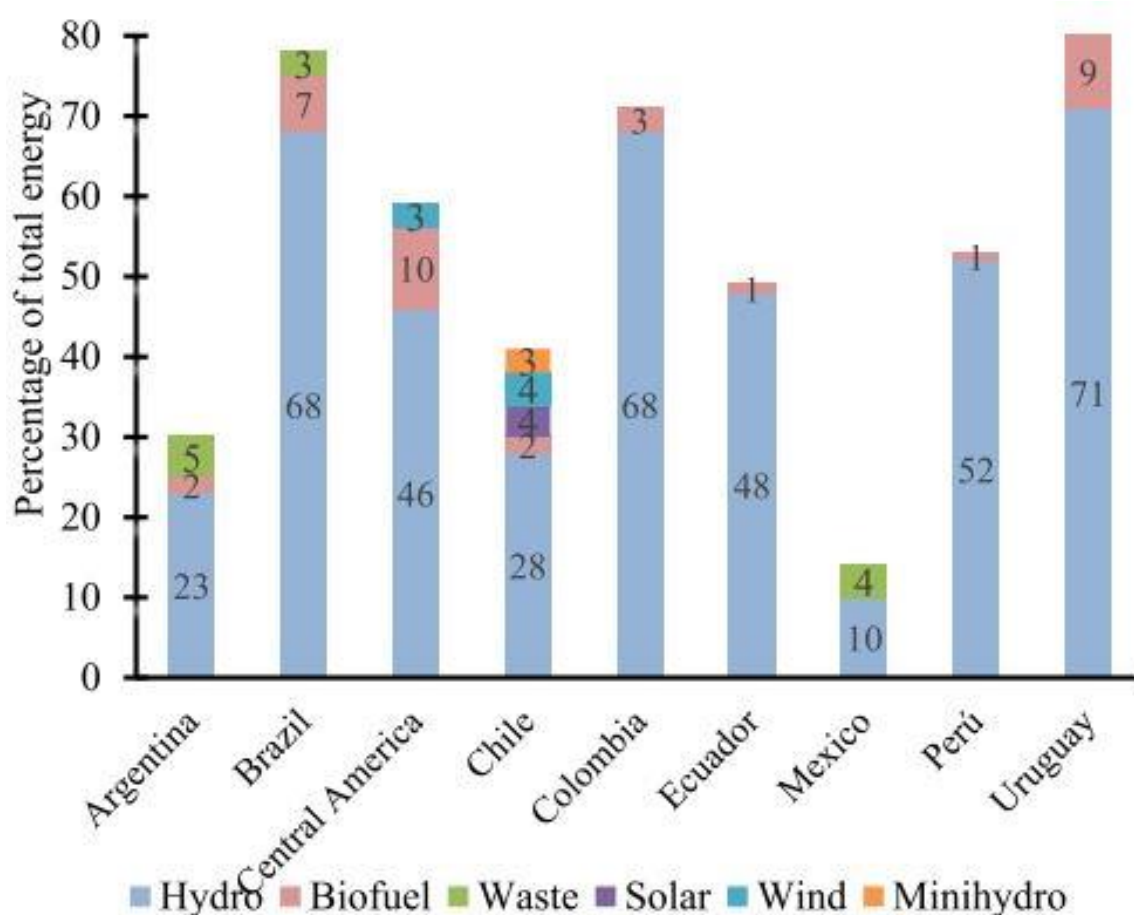


Figura 10. Geração de energia por tipo de fonte em países da América Latina

Fonte: MOYA; TENORIO; OPORTO, 2019

Para atender à crescente demanda global de biocombustíveis, o biodiesel é uma alternativa emergente ao diesel fóssil para garantir a sustentabilidade ambiental, especialmente no Brasil. O país, embora estivesse isento dessa exigência, abordado no Tratado de Kyoto, lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – PNPB. Esta medida se deve à expectativa de facilitação do

pedido de financiamento internacional. Também, garantir o fornecimento de matéria-prima aos produtores, principalmente do Nordeste, e oferecendo oportunidades de geração de emprego e renda, redução de emissões de poluentes, custos com saúde e mitigação das desigualdades regionais. Outrossim, foi estabelecido no país parâmetros qualitativos para aproveitamento do biodiesel (CERRI et al., 2017; Vieira; Nadaleti; Sarto., 2021).

A produção global de biodiesel e óleo vegetal hidrotratado atingiu 48 bilhões de litros globalmente em 2019 (IEA, 2020). Já produção brasileira para o mesmo período foi de 9,3 bilhões de litros e em 2020 foi de 10,4 bilhões de litros (EPE, 2020, 2021c). A região sul detêm a maior produção de biodiesel (45,5%), seguido da região Centro-Oeste (36,9%), essas regiões se destacam em função da abundante disponibilidade das principais matérias-primas (soja e sebo), embora o maior volume de vendas/consumo se concentre na Região Sudeste. No entanto, a demanda brasileira de biodiesel é determinada pelo percentual a ser adicionado à demanda projetada de diesel B. Conforme previsto na Resolução CNPE nº16/2018 (CNPE, 2018), em 2020 adição de biodiesel ao diesel B chegou a 12%, correspondendo a um consumo de 6,4 bilhões de litros. Desde o início do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 2005, já foram produzidos, até dezembro de 2020, mais de 47 bilhões de litros deste biocombustível. Comparativamente, o Brasil continua entre os três maiores produtores e consumidores de biodiesel no ranking internacional, após Indonésia e EUA (EPE, 2021c).

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa e é tipicamente feito de recursos biológicos não tóxicos, como óleos vegetais gorduras animais e óleo residual de cozinha. Os óleos são classificados em comestíveis e não comestíveis. No entanto, a maioria dos óleos não comestíveis contém alto teor de ácidos graxos livres. Assim, algumas etapas químicas são necessárias para produzir biodiesel, o que aumentará o custo de produção e pode reduzir o rendimento de éster (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; NAIK *et al.*, 2010; STAMENKOVIĆ *et al.*, 2020).

A produção de biodiesel é feito por diversos métodos, como uso direto e mistura de óleos brutos, microemulsões, craqueamento térmico e transesterificação (TABATABAEI *et al.*, 2019). O presente trabalho aborda apenas a transesterificação, pelo fato de ser mais utilizado na conversão de óleos e gordura em ésteres de metil de ácidos graxo (FAME).

A transesterificação consiste na reação química, entre óleos ou gorduras com um álcool de cadeia curta em excesso, ou seja, estequiometricamente, três moles de álcoois (principalmente metanol) reagem com um mol de triglicerídeos. Esse processo é geralmente realizado na presença de um catalisador (60-70°C), pressão atmosférica, 90min), resultando na produção de um éster monoalquílico (principalmente éster metílico) chamado biodiesel e glicerol como um subproduto..O álcool não reagido pode ser parcialmente recuperado e o glicerol pode ser vendido para mercados existentes para reduzir os custos de produção. A separação do glicerol é extremamente importante para melhorar a qualidade do biodiesel e evitar a formação de gases perigosos, ou seja, acetaldeído ou formaldeído durante sua combustão (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; TABATABAEI *et al.*, 2019). Na Figura 11 representa a reação química simplificada da reação de transesterificação.

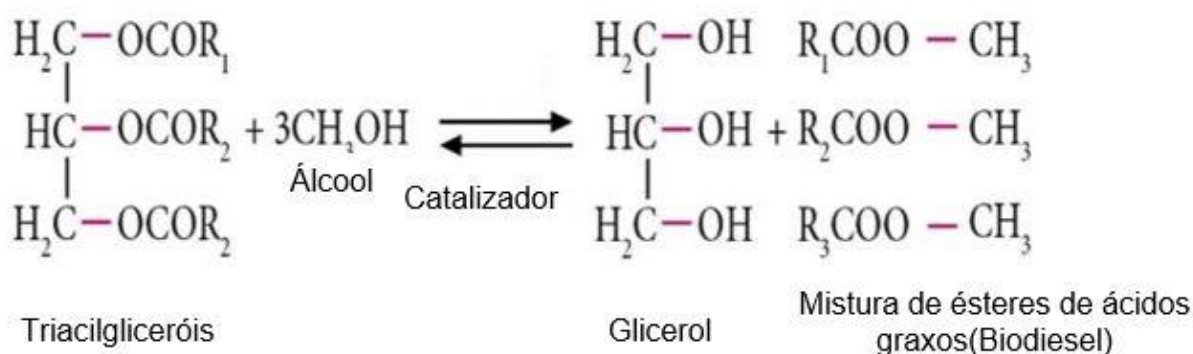


Figura 11. Reação geral de transesterificação

Fonte: Adaptado de COLOMBO *et al.*, 2019

Segundo Kaya *et al.* (2009), a transesterificação do óleo de semente de amendoim melhorou a propriedades do óleo como densidade, viscosidade, ponto de fulgor, índice de acidez e outros. E obteve uma conversão máxima de óleo em éster de 89%.

Reis *et al.*, (2020), utilizou um fungo oleaginoso (*Mucor circinelloides* URM 4182) para o acúmulo de óleos a partir de vinhaça e melaço que são subprodutos da cana-de-açúcar. Obteve um biodiesel com um valor previstos para número de cetano de 56, e Valores medidos de éster de 95,08%, viscosidade cinemática a 40 °C de 6,8 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> e densidade 889kg m<sup>-3</sup>. Os autores concluíram que os valores obtidos demonstram o potencial dos ésteres etílicos para serem potencialmente

usados como biodiesel, considerando a normativa da ANP para rotulação de biodiesel.

Sabendo que o diesel possui um percentual obrigatório de biocombustível, à exceção do transporte aquaviário, com valor vigente de 12%. A emissão varia para os diferentes tipos de veículos pesados, caminhões e ônibus urbanos. Assim, a taxa de emissão média ponderada da frota de veículos do ciclo diesel é de 7,53mg/m<sup>3</sup>, é maior taxa encontrada dentre os combustíveis analisados. O biodiesel de base éster, foi avaliado para a redução de material particulado para diferentes níveis de mistura, utilizando uma taxa média de emissão de diesel B10, obteve-se 4 mg/m<sup>3</sup> de emissão de particulados. Uma comparação progressiva da adição de biodiesel ao diesel B (B0 à B15) apresenta o impacto do uso de biodiesel base éster, decorrente incentivo do PNPB no ano de 2018. O B0 emite uma concentração de particulados para atmosfera, relativo ao setor transporte de 4,8%, este valor é superior ao registrado em 2018, enquanto a poluição total de MP2,5 na atmosfera seria 1,7% maior (EPE, 2021d).

Segundo EPE (2021 d) o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) evitou em São Paulo, 244 mortes ao ano, e que a população deixou de perder 9 dias de vida, desde o nascimento. Caso o percentual de biodiesel no diesel B atingisse 15%, haveria 104 mortes por ano a menos e a expectativa de vida aumentaria em mais 4 dias, quando comparadas à trajetória B10. Este, resultados do uso do biodiesel podem ser associados a presença em menor quantidade de Enxofre e aromáticos, e isso significa que não emitirá muitos gases tóxicos, quando comparados ao óleo diesel (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).





## **5 Artigo 1**

O artigo **Biotechnology process for biodiesel synthesis from enzymatic hydrolysate of pre-treated sugarcane bagasse**, está de acordo com as normas da Revista: **Renewable Energy**, Qualis A1 e fator de impacto 10.8.

# Biotechnology process for biodiesel synthesis from enzymatic hydrolysate of pre-treated sugarcane bagasse

## Abstract

Sugarcane bagasse is a kind of lignocellulosic biomass waste produced from sugar and alcohol production. The aim of this study was to produce biodiesel from sugarcane bagasse with a biotechnology process using microbial enzymes and a lipid accumulating yeast. Steam explosion pretreated sugarcane bagasse was subjected to enzymatic hydrolysis using in-house crude enzymes of *Trichoderma* SG2 (T SG2) with or without supplementation with a commercial enzyme (Cellic CTec2). The mixtures of both enzymes produced substantial amounts of sugars from pretreated sugarcane bagasse. A multistage hydrolysis process was used and as much as 26.92 g L<sup>-1</sup> of sugar was recorded in one stage. In another stage hydrolysis of residual biomass, 26.23 g L<sup>-1</sup> of sugar was recorded; thus maximizing the production of fermentable sugars from bagasse. The cultivation of *Rhodotorula* species R1 in sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate (BH) for lipid production was evaluated. Enrichment of the hydrolyzate with D-glucose, Y-yeast extract, and P-peptone (BH+P20D20/N0.93) produced 7.69% lipid. Accumulation of lipid increased to 10.50% at a high carbon-nitrogen ratio (BH+Y10D20/N0.2). Long-chain fatty acids (C16 and C18) were the main components of the intracellular lipid accumulated by *Rhodotorula* species R1. Similar fatty acids are found in vegetable oils currently used for biodiesel production and indicate that the yeast lipids are suitable feedstock for biodiesel production.

**Keywords:** Sugarcane bagasse; Steam explosion; *Trichoderma* SG2; biomass hydrolyzing enzymes; Three-stage hydrolysis; Oleaginous yeasts

## 1 Introduction

Microbial lipids are promising and valuable feedstock and have been a subject of intense research, mainly as a raw material for the production of biodiesel. Biofuel is sulfur-free, non-toxic, biodegradable and its combustion emits 67% fewer hydrocarbons, 78% less CO<sub>2</sub> throughout, and 47% less particulate matter than petroleum-based- diesel [1–3].

Microbial lipids are produced by oleaginous microorganisms that are capable of accumulating lipids from 20 to 70% of their dry cell biomass when cultivated under optimized conditions of excess carbon with nitrogen limitation [2,4]. The ability to synthesize lipids is found in many microorganisms including bacteria, yeasts, microalgae, and fungi. Nonetheless, yeasts are more advantageous because they have higher growth rates, produce high lipid content without endotoxin contamination [5], and have no requirement for light to grow [6]. Moreover, they contain valuable triacylglycerol present in vegetable oil employed in biodiesel production [7]. *Lipomyces*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, and *Rhodotorula* are oleaginous yeasts frequently used for lipid accumulation [6–9].

The production of biodiesel from yeast lipids still faces some technical and economic barriers especially carbon sources as high carbon to nitrogen ratio is required to maximize lipid accumulation in yeasts. Solutions to this problem include exploring the use of low-cost substrates, such as glycerol derived from biodiesel, chitin, volatile fatty acids (VFAs), and lignocellulosic biomass hydrolyzate as carbon sources [10].

49 The use of lignocellulosic sugars for lipid synthesis will require the pretreatment and  
50 hydrolysis aspects of the production of second-generation ethanol (pretreatment, hydrolysis,  
51 and fermentation), which consists of a pretreatment step to deconstruct the structure of  
52 lignocellulose (cellulose, hemicellulose, and lignin), to enable access of cellulolytic and  
53 xylanolytic enzymes to the polysaccharide (cellulose) [11,12]. Pretreatment of lignocellulose  
54 biomass produces inhibitors of cellulolytic enzymes and fermentation by yeast. The presence  
55 of inhibitors such as hydroxyl methyl furfural (HMF), furfural, phenolic compounds, acetic  
56 acid, and formic acid in pretreated biomass calls for a detoxification process [13–15] prior to  
57 further use in fermentation. Thus the selection of strains that can resist such inhibitors is also  
58 an important factor to consider in the production of biodiesel from lignocellulose hydrolysate.

59 This study aims to use in-house biomass-hydrolyzing enzymes of *Trichoderma* SG2  
60 (US Patent 9,617,574 B2) to hydrolyze pretreated sugarcane bagasse and synthesize lipids  
61 from the hydrolyzate using an oleaginous yeast, *Rhodotorula* R1; and characterization of the  
62 yeast lipid for biodiesel production.  
63

## 64 2. Materials and Methods

### 65 2.1 Materials

66 The pretreated sugarcane bagasse (57.68% of cellulose, 12.41% of hemicellulose,  
67 7.89% of lignin and 2.20% ash) was received from the National Center for Research in  
68 Energy and Materials (CNPEN), São Paulo, Brazil; which employed a steam explosion  
69 process in a reactor (190°C, 10 min) to prepare the pretreated by steam-exploded sugarcane  
70 bagasse (SESCB). *Trichoderma* SG2 (US Patent 9,617,574 B2) and *Rhodotorula* R1 were  
71 received from the Bioprocessing and Biofuel Research Lab, Auburn University at  
72 Montgomery. The commercial enzyme used for in-house enzyme supplementation was  
73 Novozyme Cellic CTec2 (Cel2), purchased from Sigma-Aldrich.

74 The lignocellulose-degrading fungus *Trichoderma* SG2 [19] and the lipid  
75 accumulating yeast, *Rhodotorula* R1 were cultivated on potato dextrose agar at 30°C and  
76 stored at 4°C. *Trichoderma* SG2 (*T. SG2*) agar blocks of approximately 1 cm<sup>2</sup> were cut in the  
77 agar culture and used as the inoculum for enzyme production. The *Rhodotorula* R1 inoculum  
78 was prepared in sterile distilled water using cells scraped from the agar culture. *Rhodotorula*  
79 R1 cell suspension was standardized by diluting with sterile distilled water to an absorbance  
80 of 1.576 at 600 nm and served as the inoculum.  
81

### 82 2.3 Enzyme production

83 The standard culture medium for cellulolytic and xylanolytic enzyme production was  
84 contained the following ingredients: 1 g L<sup>-1</sup> of peptone, 0.5 g L<sup>-1</sup> of yeast extract, 0.5 g L<sup>-1</sup> of  
85 Tween, 80.2 g L<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 g L<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g L<sup>-1</sup> of Mg.SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 g L<sup>-1</sup>  
86 CaCl<sub>2</sub>, 0.003 g L<sup>-1</sup> of FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O [19] and 2 mL of trace element solution [20]. To 50 mL of  
87 the medium in 125 mL Erlenmeyer flasks, 0.5 g of shredded paper was added and autoclaved  
88 at 121°C for 20 min. After cooling at room temperature, each flask was inoculated with two  
89 agar blocks of the *Trichoderma*. SG2 culture on potato-dextrose agar plates. Subsequently, the  
90 inoculum was incubated for 6 days at 30°C with shaking at 200 rpm in an orbital incubator.  
91 Enzymes were recovered by centrifugation (FANEM, model 206 BL) at 5,000 rpm for 10  
92 min. The supernatant was used as the non-optimized *Trichoderma* SG2 crude enzyme.  
93

### 94 2.4 Enzyme assays

95 The supernatant was tested for enzymatic activities for cellulase (filter paper cellulase)  
96 and xylanase as previously described [19, 21]. Subsequently, total reducing sugar (TRS) was  
97 determined by dinitrosalicylic acid reagent (DNS) method [22]. The enzymatic activity ( $\mu\text{mol}$   
98 or units  $\text{mL}^{-1} 30 \text{ min}^{-1}$ ) was read from a standard glucose curve.  
99

## 100 2.5 Enzymatic hydrolysis

### 101 2.5.1 Steam exploded sugarcane bagasse (SESCB) hydrolysis with cellulolytic- 102 xylanolytic enzymes from *T. SG2* and supplementation with commercial cellulase Cellic 103 CTec2 (Cel2)

104 The non-optimized *T. SG2* enzyme used in the hydrolysis test displayed approximately  
105 enzymatic activity of  $9.88 \pm 3.09 \text{ U mL}^{-1}$  for cellulase and  $35.91 \pm 9.24 \text{ U mL}^{-1}$  for xylanase  
106 The Cel2 enzyme was applied as recommended by the supplier [23] at a dosage of (1.5 g of  
107 enzyme  $\text{g}^{-1}$  of cellulose) considering the cellulose content of SESCOB described in section 2.1.  
108 Enzymatic hydrolysis was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks at  $50^\circ\text{C}$ , using 1 and 1.5 g  
109 of SESCOB, using Lactostab (LNF) as the antimicrobial agent (Table 1). The flasks were  
110 sealed with parafilm. The reaction mixtures were incubated in a Shaker at 100 rpm for 18 and  
111 66 h of incubation.

112 At the end of 18 h, the solid residue was separated from the liquid phase by  
113 centrifugation at 5,000 rpm for 10 min. An aliquot of the supernatant was characterized for  
114 the amount of reducing sugar. The residual solids were returned to the respective flasks, and  
115 re-suspended in 10 ml of 50 mM sodium acetate buffer, and Lactostab antimicrobial agent was  
116 added, and incubated for another 48 h, totaling 66 hours of saccharification process.  
117

118 Table 1. Steam exploded sugarcane bagasse (SESCB) hydrolysis parameters.

Enzymes	Function	Solids rate (%)	
		10	15
<i>T. SG2</i>	Cellulase and xylanase	10 mL enzyme	10 mL enzyme
<i>T. SG2</i> + Cel2	Cellulase	10 mL enzyme + 0.03 g enzyme g <sup>-1</sup> substrate	10 mL enzyme + 0.03 g enzyme g <sup>-1</sup> substrate

119

### 120 2.5.2 Effect of low dose cellulolytic-xylanolytic *T. SG2* enzyme on the Steam explosion 121 sugarcane bagasse (SESCB) hydrolysis process

122 The hydrolysis of SESC B with the enzyme *T. SG2* diluted 50% (1:1 ratio of distilled  
123 water and non-optimized crude enzyme made in-house) was carried out at solids load of 10%  
124 (w/v) and adjusted to pH 5 with minute aliquots of NaOH (2M) followed with addition of the  
125 antimicrobial and incubation at 50°C with stirring at 100 rpm. The saccharification was  
126 carried out with different enzyme dosages:

127 I) SH1-10 mL of the undiluted enzyme complex of *T. SG2* supplemented with Cel2 at  
128 a rate of 0.03 g g<sup>-1</sup> SESC B;

129 II) SH2-10 mL of the undiluted enzyme complex of *T. SG2* supplemented with Cel2 at  
130 a rate of 0.0058 g g<sup>-1</sup> SESC B;

131 III) SH3- 50% diluted *T.SG2* enzyme complex, supplemented with Cel2 at a rate of  
132 0.03 g g<sup>-1</sup> SESC B;

133 IV) CW-Control with water, SESC B was suspended in 10 ml of distilled water.

134 Thereafter incubation supernatants were analyzed for sugar content (TRS).

135

### 136 2.5.3 Digestibility of the SESC B

137 The digestibility of cellulose and hemicellulose at high load of SESC B solids 10%  
138 (w/v) was also carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks, without stirring, at pH 5 adjusted  
139 with minute aliquots of NaOH (2M) at 50°C. The conditions of the first stage of hydrolysis  
140 were performed as described in step SH3 of 2.5.2. The hydrolysis times (42 and 63 h) were  
141 used:

142 a) SHS - the solid was not separated from the supernatant and without the addition of  
143 new enzyme;

144 b) SHR1 - with separated residual solid and without addition of new enzyme;

145 c) SHR2- with separated residual solid and with addition of new enzyme Cel2 at a  
146 dosage rate of the 0.0058 g g<sup>-1</sup> SESC B;

147 d) SHR3- with separated residual solid and addition of 5 µL of undiluted crude  
148 enzyme *T. SG2*;

149 e) SHR4- with separated residual solid and addition of 2.5 µL of undiluted crude  
150 enzyme *T. SG2* and Cel2 at a dosage rate of the 0.0029 g g<sup>-1</sup> SESC B;

151 f) CWS- control in distilled water without separation;

152 g) CWR - control with separated residual solid added to distilled water.

153 To all processes that separate the solid and liquid fractions (b-e), at each stage, 10 mL  
 154 of solid re-suspension buffer was added to keep the system fluidized. The separation process  
 155 was carried out as described in the last paragraph of item 2.5.1. To prevent microbial growth,  
 156 diluted antimicrobial agent was added to all treatments (a-g) and at all stages. At pre-defined  
 157 time intervals, the digestibility of SESCOB was monitored by measuring the amount of total  
 158 reducing sugars released from the substrate.

159

## 160 2.6 Lipid production in lignocellulosic biomass hydrolyzate

161 The non-detoxified fermentable sugarcane bagasse hydrolysate (BH) was used in the  
 162 production of cellular oil by *Rhodotorula R1* were from all the processes described in the  
 163 items 2.5.1, 2.5.2 and 2.5.3, except for the control with water. In a 125 mL Erlenmeyer flask,  
 164 50 mL of culture medium were added with variation of its composition according to Table 2.  
 165 The culture media were sterilized at 121°C for 10 min, inoculated with 1% of the yeast  
 166 inoculum and incubated at 30°C, shaking at 130 rpm for 5 days. Each experiment was  
 167 performed with three replications.

168

169 Table 2. Parameters analyzed in lipid production by *Rhodotorula R1*.

	pH	Glucose (g L <sup>-1</sup> )	Yeast extract (g L <sup>-1</sup> )	Peptone (g L <sup>-1</sup> )	Nitrogen (g L <sup>-1</sup> )
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>0</sub> *	6.62	0	10	20	3.77
Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub>	6.62	20	10	20	3.77
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>5</sub>	6.62	5	10	20	3.77
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>5</sub> / pH <sub>5,56</sub>	5.56	5	10	20	3.77
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub>	6.62	20	10	20	3.77
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>30</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>5,31</sub>	6.62	20	10	30	5.31
BH+Y <sub>20</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>5,11</sub>	6.62	20	20	20	5.11
BH+P <sub>20</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>0,93</sub>	6.62	20	0	20	0.93
BH+Y <sub>10</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>0,2</sub>	6.62	20	10	0	0,2

170

171

172

\*Y, yeast extract, Peptone; D, glucose; N, nitrogen. These letters followed by subscript numbers means the dosage of the component used.

173

### 2.6.1 Dry cell weight estimation and Lipid extraction

174 The accumulated biomass of each flask was recovered by centrifugation at 5,000 rpm  
175 for 10 min and dried until constant weight at 60 °C. Total biomass was determined by  
176 gravimetric assay ( $\text{g L}^{-1}$ ).

177 Lipid extraction was preceded by acidic cell lyses of dry biomass. For this purpose, 10  
178 mL of 2 M HCl was added to 200 mg of dry yeast biomass and incubated in a water bath at  
179 60°C for 2 h [24, 25]. The lipid was extracted by the Soxhlet method by solvent reflux in an  
180 intermittent process. The temperature of the oil and hexane mixture was maintained at 62°C  
181 and the extraction time for each cartridge was 4 h. After extraction, the hexane was  
182 evaporated via heating by a heating blanket keeping the temperature at 68°C to avoid the loss  
183 of important volatile compounds in the oil and the lipids were quantified gravimetrically. The  
184 lipid concentration ( $\text{g L}^{-1}$ ), the accumulated lipid (%) was determined according to Ananthi et  
185 al. [26].  
186

## 187 2.6.2 Analysis of fatty acids composition of biodiesel

188 To determine the fatty acids composition, the lipids of Oleaginous yeast *Rhodotorula*  
189 *R1* was converted to fatty acid methyl esters (FAMES) by transesterification by basic  
190 catalysis. Initially, the alkaline agent was dissolved in methanol (0.0068 g of KOH in 0.52 ml  
191 of methanol) and added to 1 mL of oil under vigorous and constant stirring, which it was  
192 introduced into a simple reactor equipped with a reflux device. The system remains at reflux  
193 for 30 min at 80°C. The FAMES was washed with hydrochloric acid. (5% v/v), with the  
194 aqueous phase being discarded. The organic phase was washed with saturated NaCl solution  
195 [27, 28].

196 The FAMES were identified by analyzing normalized area, and their respective  
197 retention times (TR) were compared to the FAME 37-MIX standard (Supelco, USA) using a  
198 Flame Ionization Gas Chromatograph - GC / FID 2010 (Shimadzu) and column SP 2560. To  
199 analyze the lipid profile, the operating conditions were: hydrogen as carrier gas at a flow of  
200  $1.2 \text{ mL min}^{-1}$ , division mode 1:100, injected sample volume of 1 mL, initial oven temperature  
201 at 100°C by heating at a similar rate of  $3^\circ\text{C min}^{-1}$  to 200°C. The temperature of the injector  
202 and detector was adjusted to 250°C.  
203

## 204 2.7. $^1\text{H}$ nuclear resonance magnetic (NMR)

205 Nuclear magnetic resonance analyzes of the liquid samples were performed using  
206 Bruker Avance III HD operating at frequencies of 400 MHz for protons with a 5 mm F-BBO  
207 multinuclear probe at a temperature of 25°C. Spectra were collected from 64K data points.  
208 The 90° pulses were calibrated for each experiment with 32 scans, 4 simulated scans, 0.1 line  
209 widening and recovery time (D1) of 5.0 s. The pulse sequence used to eliminate the residual  
210 water was noesygppr1d (Bruker). Maleic acid [0.01 M] in deuterated water containing 0.01%  
211 TMS (tetramethylsilane, chemical shift reference,  $\delta = 0.0 \text{ ppm}$ ) as standard solution [29]. The  
212 standard solution was used in all  $^1\text{H}$  NMR analyzes for sugarcane bagasse hydrolysate (BH),  
213 corresponding to HW-SESCB, bagasse liquor hydrolyzed with distilled water; EH-SESCB  
214 one stage, enzymatically hydrolyzed bagasse liquor up to 21 h; EH-SESCB two and three-  
215 stage, 42 and 63 h accumulated liquor from enzymatically hydrolyzed bagasse; EH-SESCB  
216 three-stage, accumulated liquor from all stages (21, 42 and 63 h) of enzymatically hydrolyzed  
217 bagasse. Results are expressed in part per million (ppm).  
218

## 219 2.8 FTIR analyses



220 Solid materials and cellular lipid were analyzed by Fourier transform infrared  
 221 spectroscopy (FT-IR), using Shimadzu model IRPrestige-21. Spectra was recorded from 400  
 222 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 32 scans, transmittance mode and 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution.  
 223

## 224 2.9. X-ray diffraction (XRD)

225 X-ray diffraction data were captured in a Shimadzu Scientific Instruments  
 226 diffractometer model XRD-6000 (Kyoto, Japan) using monochromatic CuK $\alpha$  radiation (1.54  
 227 Å) with a voltage of 30KV, Current of 30mA and step 0.02. The goniometer swept a 2 $\theta$  range  
 228 between 20° and 60° at a scan rate of 2°/min.  
 229

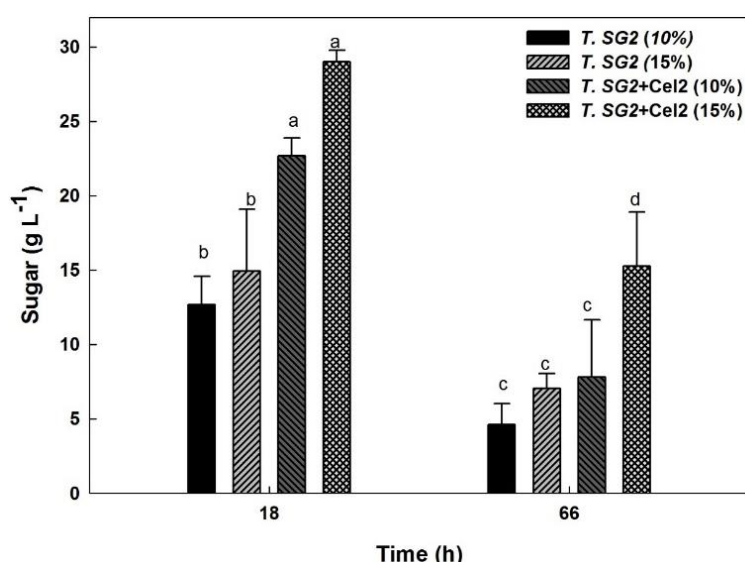
## 230 2.10. Statistical analyses

231 The hydrolysis and lipid production tests were statistically evaluated by analysis of  
 232 variance (ANOVA) and when significant, the Tukey test was performed for comparison of  
 233 means at 5% probability level. The software Statistic 7.0 (Statsoft, USA) was used for data  
 234 interpretation.  
 235

## 236 3. Results and discussion

### 237 3.1 Hydrolysis of SESCOB with enzyme from *T. SG2* and *T. SG2*supplemented with Cel2

238 SESCOB with low lignin content was hydrolyzed and its conversion to fermentable  
 239 sugars was evaluated using cellulolytic and xylanolytic enzymes produced by *T. SG2* and *T.*  
 240 *SG2* supplemented with a Cel2 cellulase. The concentration of reducing sugars released at the  
 241 initial hydrolysis stage (18 h) increased with increasing solids loading (Fig. 1). Similar results  
 242 are reported in other studies performing enzymatic hydrolysis using increasing rates of solids  
 243 [16,30,31].  
 244



245 Fig.1. Comparison of enzymatic hydrolysis using an enzyme complex produced by *T. SG2* and *T. SG2*  
 246 supplemented with Cel2 for solids ratios of 10 and 15%. *T. SG2* (10%), undiluted crude enzyme *T. SG2* enzyme  
 247 (10 mL); *T. SG2* + cel2 (10%), undiluted crude enzyme *T. SG2*enzyme (10mL) and Cel2 0.03g  $\text{g}^{-1}$  SESCOB; *T.*  
 248 *SG2* (15%), undiluted crude enzyme *T. SG2* enzyme (10 mL); *T. SG2* + Cel2 (15%), undiluted crude enzyme *T.*  
 249 *SG2* enzyme (10mL) and Cel2 0.03g  $\text{g}^{-1}$  SESCOB. Bars with the same letter do not differ significantly according  
 250 to Tukey's test at 5% between enzyme cocktails.  
 251

252           Supplementation of *T. SG2* enzyme with Cel2 cellulase increased the conversion yield  
253 of total reducing sugars up to 2-fold. At 10% of solids, its sugar production increased from  
254 12.66 to 22.66 g L<sup>-1</sup> and with 15% from 14.99 to 29 g L<sup>-1</sup>. The increase in the conversion of  
255 SESCOB into sugars can be associated with the addition of the commercial cellulase Cel2 [32]  
256 and the high beta-glucosidase activity of *T. SG2* enzyme [19] which converts cellobiose units  
257 to glucose [18]. In the study of Rodrigues et al. [33], hydrolysis of hydrothermally pretreated  
258 corn straw using a Celluclast enzyme supplemented with  $\beta$ -glucosidase significantly  
259 improved the overall hydrolysis yield, with a conversion of 81% being achieved. Brar et  
260 al. [16] used a cocktail (Cel2 and xylanase from *T. lanuginosus*) in the hydrolysis of sugarcane  
261 bagasse pretreated by steam explosion and obtained total sugar levels of 38.7 g L<sup>-1</sup>, 55.8 g L<sup>-1</sup>  
262 and 75.2 g L<sup>-1</sup> in 96 h of hydrolysis, at respective solids ratios of 10, 15 and 20% (w/v).

263           In the second stage, solid resuspension in 0.05 M of sodium acetate buffer (Na 50  
264 mM) and diluted antimicrobial, revealed substantial remaining enzyme activity and further  
265 saccharification of the residual substrate. It is possible that enzymes bound to the residual  
266 substrate are recycled upon resuspension in buffer. However, the release of sugars is reduced  
267 compared to that observed in the first 18 h due to reduction of enzyme activity.

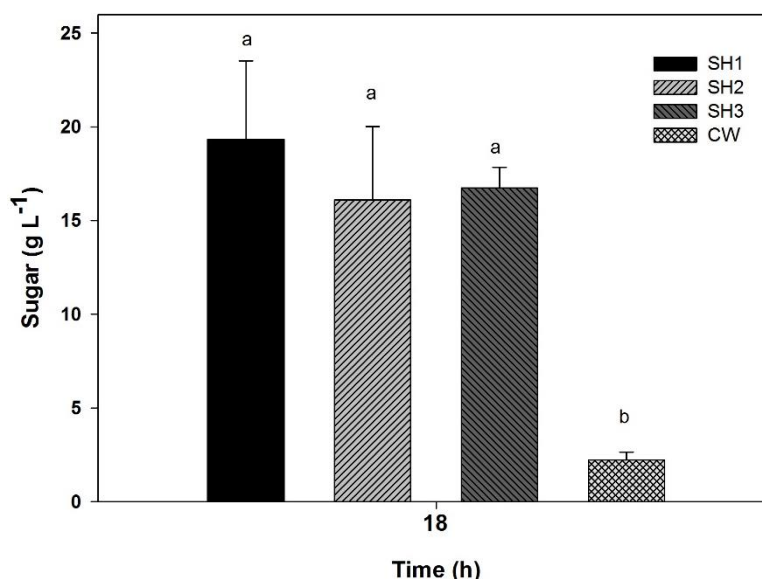
268           The reduction in enzyme activity can be associated with several factors such as: the  
269 desorption of the enzyme into the liquid phase [34]; adsorption of cellulase by lignin that  
270 limits the accessibility of the enzyme to the cellulose chain, but enzyme can also bind  
271 nonspecifically to hydrolytic enzymes [17,35,36]; presence of inhibitors from pretreatment  
272 process [13]; ethanol formation during saccharification [37]; and transformation of the  
273 cellulose structure into a less digestible form [38].  
274

### 275 **3.2 Hydrolysis of SESCOB with the low-dose cellulolytic-xylanolytic enzyme from *T. SG2***

276           Considering the mixing and heat transfer factor in saccharification at high solids  
277 loading, the hydrolysis trials with 50% diluted crude enzyme *T. SG2* with cel2  
278 supplementation were carried out with a solids ratio of 10%, for a more fluidized system [39].  
279 Water in enzymatic hydrolysis of biomass polysaccharides is an important factor, since it  
280 functions as a reagent in the cleavage of glycosidic bonds, as well as a diffusion agent for the  
281 enzymes, substrates and sugars from hydrolysis [40].

282           The saccharification process with diluted crude enzyme *T. SG2* at 50% (SH3),  
283 obtained significant amounts of total reducing sugars, around 16.73 g L<sup>-1</sup> (Fig. 2). A close  
284 value was obtained with the enzyme formulation SH2 (16.1g L<sup>-1</sup>), which contains a lower  
285 dosage of Cel2. Both formulations produced lower concentration of reducing sugars than the  
286 enzyme formulation SH1 (19.33 g L<sup>-1</sup>).  
287  
288  
289  
290

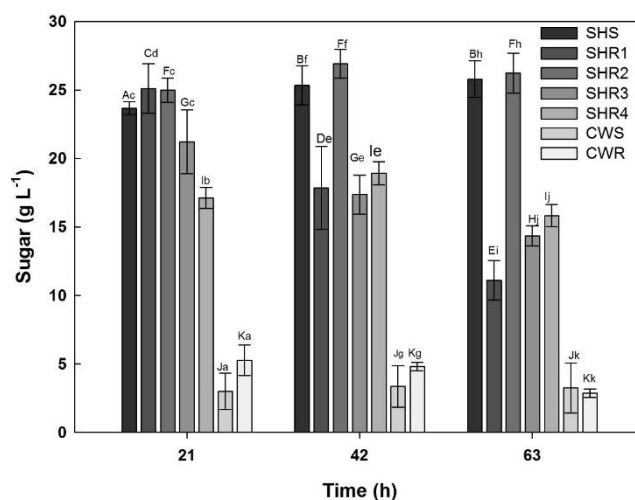
291



292 Fig. 2. Effect of different doses of enzyme on the hydrolysis of SESCOB. SH1, hydrolysis with addition of  
 293 undiluted crude enzyme *T. SG2* (10 mL + Cel2 0.03 g g<sup>-1</sup> SESCOB); SH2, hydrolysis with addition of undiluted  
 294 crude enzyme *T. SG2* (10 mL + Cel2 0.0058 g g<sup>-1</sup> SESCOB; SH3, addition of 50% diluted crude enzyme *T. SG2* +  
 295 Cel 2 0.03 g g<sup>-1</sup> SESCOB. Bars with the same letter do not differ significantly according to Tukey's test at 5%.  
 296

### 297 3.3 Effect of cellulase and xylanase loadings on the enzymatic hydrolysis of SESCOB

298 Cellulose digestibility was determined using high solids loading (10% w.v<sup>-1</sup>) (Fig. 3).  
 299 From the first stage of SESCOB hydrolysis (Fig. 3), a high synergistic efficiency between the  
 300 50% of *T.SG2* enzyme and Cel2 (0.03 g enzyme g<sup>-1</sup> of substrate) was exhibited, since that the  
 301 values obtained for total reducing sugars (SHS - 23.66 g L<sup>-1</sup>, SHR1- 25.11 g L<sup>-1</sup>, SHR2 -  
 302 24.98 g L<sup>-1</sup>, SHR3- 21.22 g L<sup>-1</sup> and SHR4- 17.11 g L<sup>-1</sup>) was observed. These values are  
 303 slightly higher than those obtained in the previous experiment SH3 (Fig.2), which has the  
 304 same enzyme formulation.  
 305



306 Fig. 3. Three-stage enzymatic hydrolysis: SHS, hydrolysis without liquor separation and without addition of  
 307 enzyme; SHR1, hydrolysis with liquor separation and without addition of enzyme; SHR2, with liquor separation  
 308 and addition of Cel2 0.0058 g g<sup>-1</sup> SESCOB; SHR3, with liquor separation and addition of enzyme *T. SG2* (5μl);  
 309 SHR4, with liquor separation and addition of Cel2 enzyme 0.0029 g g<sup>-1</sup> SESCOB + 2.5 μl *T. SG2* Lowercase  
 310 letters represent Tukey's test at 5% between enzyme cocktails, and uppercase letters between times.

311 The SHS configuration (the liquor remains during the entire hydrolysis process), in the  
 312 three analyzed stages (21, 42 and 63 h), the sugar production remained constant. The non-  
 313 increase in sugar concentration over the hydrolysis time can be attributed to the presence of  
 314 inhibitors or inhibition by the products formed,. The same factors can be attributed to the  
 315 SHR1 saccharification (liquor is removed at each phase), as it showed a reduction in sugar  
 316 concentration over time. Roberts et al. [40], added a high loading of  $\beta$ -glucosidase to ensure  
 317 that the available cellobiose could be hydrolyzed into glucose and to minimize inhibition of  
 318 the end product of cellulase activity.

319 Therefore, the cellulase accumulation of saccharification SHR2 shows better results in  
 320 the two subsequent stages (42 and 63 h), presenting TRS values of 26.92 and 26.23 g L<sup>-1</sup>.  
 321 Compared to other processes, SHR3 (17.37 and 14.35 g L<sup>-1</sup>) and SHR4 (18.92 and 15.83 g L<sup>-1</sup>)  
 322 <sup>1</sup>), respectively. Also, according to Fig.3, the increase in sugar concentration was directly  
 323 related to the amount of cellulase added, since SHR3 is treatment received only *T. SG2*  
 324 enzyme complex that has low activity for cellulase and high activity for xylanase. SHR4 a  
 325 mixture of *T. SG2* and Cell2, despite the addition of cellulase (Cel2), this mixture presented a  
 326 lower amount of cellulase in relation to SHR3.

327 The increase in sugar production and consequently in hydrolysis yield is due to the  
 328 elimination of sugars from the system, i.e. the feedback inhibition caused by sugar  
 329 accumulation was greatly reduced [35,41]. Thus, fresh enzyme addition can be considered an  
 330 effective method to compensate the loss of enzyme activity; however, more enzyme addition  
 331 increases more cost of the process.

### 332 3.4 <sup>1</sup>H nuclear resonance magnetic (NMR) of the sugarcane bagasse hydrolysate (BH)

333 Quantification of glucose and xylose was performed by nuclear magnetic resonance  
 334 spectroscopy (NMR). The <sup>1</sup>H NMR experiment was used to assess the profiles of metabolites  
 335 derived from the hydrolysis of sugarcane bagasse (Table 3), using a pre-saturation pulse  
 336 sequence to eliminate residual water.

337

338 Table. 3. Metabolite profiles of sugarcane bagasse hydrolysate (BH)

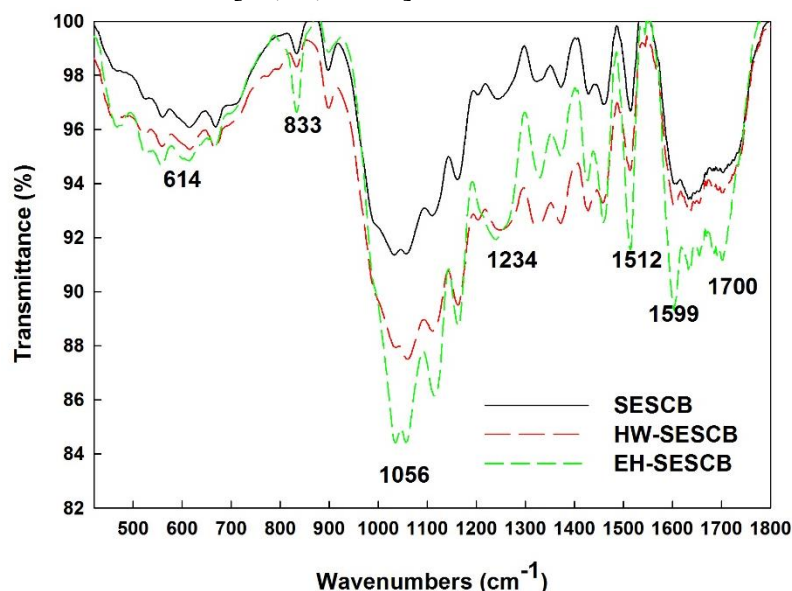
	EH- SESCBone- stage	EH- SESCBtwo and three- stage	EH- SESCBthree- stage	HW-SESCB
Ethanol	0.0087±0.003 *	0.0003±0.0002	0.0067±0.0002	0.0015±0.0003
Acetic Acid	0.0367±0.011	0.0069±0.002	0.0260±0.001	0.0069±0.0003
$\alpha$ -glucose	0.0697±0.025	0.0243±0.001	0.0999±0.002	0.0011±0.0001
$\beta$ -glucose	0.0281±0.014	0.0183±0.016	0.0345±0.002	**ND
$\alpha$ -xylose	0.0255±0.014	0.0117±0.008	0.0283±0.001	0.0063±0.0002
$\beta$ -xylose	0.0256±0.012	0.0141±0.012	0.0335±0.002	0.0053±0.0001
Total xylose	0.051	0.026	0.062	0.012
Total glucose	0.098	0.043	0.134	0.001

339 \*Data are expressed as “mean  $\pm$  standard deviation” of three replicates.\*\*ND, not detected. H, hydrolysis. And,  
 340 enzyme. W, water. SE, steam explosion.SCB, sugarcane bagasse;HW-SESCB, bagasse liquor hydrolyzed with  
 341 distilled water; EH-SESCB one-Stage, enzymatically hydrolyzed bagasse liquor up to 21 hours; EH-SESCB two  
 342 and three-Stage, 42 and 63 h accumulated liquor from enzymatically hydrolyzed bagasse; EH-SESCB three-  
 343 stage, accumulated liquor from all stages (21, 42 and 63 h) of enzymatically hydrolyzed bagasse  
 344

345 In the EH-SESCB samples that contain the accumulated liquor from all stages of the  
 346 enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse (21, 42 and 63 h) the presence of 2.03 ppm of  
 347 butanediol was detected. In the HW-SESCB sample (sugar cane bagasse liquor hydrolyzed  
 348 with distilled water) there was a greater presence of impurities together with a decrease in  
 349 carbohydrates, acetic acid and ethanol. Formic acid (8.43 ppm) was also detected in the HW-  
 350 SESCB sample. In general, SESCB hydrolysates (sugar bagasse pre-treated by steam  
 351 exploitation) contain a compound such as acetic acid that can inhibit the hydrolysis and  
 352 fermentation processes [42]. The liquor from the HW-SESCB sample contains formic acid,  
 353 which is also an inhibitory compound, probably from the pre-treatment process of sugarcane  
 354 bagasse [43].  
 355

### 356 3.5 FT-IR and XRD of the solid fraction

357 FTIR spectroscopic analysis was employed to investigate the structural change of  
 358 lignocellulosic biomass pretreated and hydrolyzed with water and enzymes (Fig.4). The  
 359 relative transmittance of the samples spectra demonstrated significantl changes. The spectrum  
 360 showed areas of lower and higher transmittance which represents the difference of the most  
 361 degraded sample (enzyme treated) and the less degraded samples (pretreated bagasse  
 362 suspended in water). Fig. 4 shows a clear band at  $833\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to the  $\beta$ -  
 363 glycosidic bonds between the sugar units, revealing the breakdown of hemicellulose by the  
 364 enzyme complex [44]. The structures of the lignin C-C bonds of the aromatic lignin ring  
 365 (acetyl group between lignin and hemicellulose, furan ring) can be identified in the spectrum  
 366 from  $1422$  to  $1600\text{ cm}^{-1}$ [13,38,44–46].



367 Fig. 4. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum for the steam explosion  
 368 pretreated bagasse (SESCB), hydrolyzed with water (HW-ESCB) and hydrolyzed with  
 369 enzymes (EH-SESCB).  
 370

371 The Figure 4 presented the FTIR spectrum with a peak at  $1056\text{ cm}^{-1}$  represents the C-  
 372 O bond (aliphatic alcohol and ethers) signifying the presence of the cellulose crystal structure

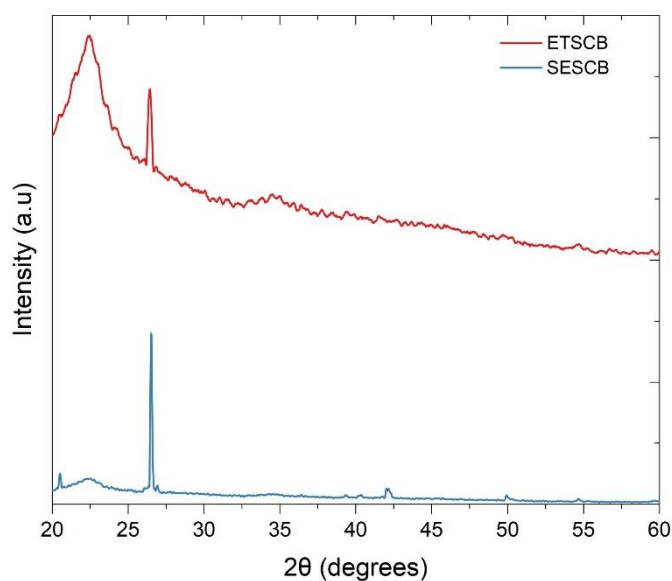
373 [13,47]. The peak at  $1234\text{ cm}^{-1}$ , a C-O-C bond represents the aryl-alkyl ether bond in lignin  
 374 [46]. The band at  $1700\text{ cm}^{-1}$  (combined with  $1234\text{ cm}^{-1}$ ) is assigned to the C-O stretch on the  
 375 non-conjugated ketone, carbonyl and ester groups, which is related to the residual lignin-  
 376 carbohydrate complexes [48]. The peak at  $614$  is assigned to  $I_{\beta}$  homocyclic cellulose and  $I_{\alpha}$   
 377 tricyclic cellulose, respectively [49].

378 The peaks  $1234\text{ cm}^{-1}$  and  $1422$  to  $1700\text{ cm}^{-1}$ , indicated that to maximize the hydrolysis  
 379 it was necessary to apply specific enzymes to degrade the lignin and after hydrolysis the  
 380 residual solid was more recalcitrant material to the attack of the enzymes of cellulase and  
 381 xylanase type, due to the presence of aromatic groups that belongs to the structure of lignin.  
 382 Hydrolysis in distilled water (control without enzyme) presents differences from the  
 383 enzymatic one, i.e., lower peak intensity indicating a lower efficiency in structure breakdown.

384 Fig. 5 shows the XRD patterns and relative crystallinity of the solid fraction from  
 385 steam explosion pretreated bagasse (SESCB) and pretreated bagasse enzymatically  
 386 hydrolyzed by cellulases and xynalases from T. SG2 enzyme supplemented with commercial  
 387 cellulase Cellic CTec2 (ETSCB).

388 As shown in Fig. 5, pre-treated bagasse (SESCB) exhibited diffraction peaks close to  
 389  $22.6^{\circ}$  originating from cellulose I. The increase in the intensity of the peak in bagasse  
 390 subjected to the action of enzymes (ETSCB) indicates an increase in the bagasse crystallinity  
 391 that can be attributed to a greater exposure of crystalline substances due to the removal of  
 392 non-cellulosic components, such as lignin and hemicellulose. The angle around  $20^{\circ}$  which  
 393 corresponds to amorphous cellulose, its characteristic peak was narrower than cellulose I, in  
 394 bagasse (SESCB) and does not appear in bagasse subjected to the action of enzymes  
 395 (ETSCB), confirming the removal of amorphous components.(mainly lignin and xylan)  
 396 [12,44,50].

397 This indicates that the partial removal of hemicellulose and lignin induced by the pre-  
 398 treatments promoted a decrease in the amorphous fraction of the biomass. However, it did not  
 399 affect the attributes of enzymatic hydrolysis, causing other factors (such as porosity and  
 400 accessibility to cellulose, for example) to have stronger effects on the efficiency of enzymatic  
 401 hydrolysis of pretreated [51,52].



402 Fig.5. X-ray diffractograms for SESCOB, steam explosion pre-treated bagasse and ETSCB,  
 403 bagasse pre-treated by steam explosion subjected to the action of enzymes.  
 404  
 405

### 406 3.6 Effect of sugarcane bagasse hydrolysate (BH) as carbon source on cellular lipid 407 production

408 The results presented in Table 4 demonstrates that the enrichment of sugarcane  
409 bagasse hydrolysate (BH) with commercial D-glucose increased the production of biomass  
410 and lipids. Obtaining a lipid production of 0.13 mg L<sup>-1</sup>, 0.45 mg L<sup>-1</sup>, and 0.82 mg L<sup>-1</sup> for the  
411 treatments of BH+Y<sub>10</sub>P<sub>20</sub>D<sub>0</sub> < BH+Y<sub>10</sub>P<sub>20</sub>D<sub>5</sub> < BH+Y<sub>10</sub>P<sub>20</sub>D<sub>20</sub>, respectively. However, it can  
412 be shown that the increase in lipid production is associated with the increase in the C/N ratio  
413 of the culture medium, as carbon source added due to the addition of glucose; since  
414 oleaginous yeasts increase the accumulation of lipids in conditions of excess carbon and  
415 nitrogen limitation. Therefore, for the lipid production process, a low C/N ratio is  
416 recommended, since the yeast obtains ammonium ions from the action of the AMP-deaminase  
417 enzyme that cleaves adenosine monophosphate into inosine monophosphate and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [5,53].

418 Therefore, it is very important to optimize the C/N ratio of sugarcane bagasse  
419 hydrolysate. From the results, the yeast *Rhodotorula RI* obtained higher lipid production  
420 when using a nitrogen concentration lower than 1 g L<sup>-1</sup>, and the values extracted for lipid were  
421 1.57 and 1.40 g L<sup>-1</sup> (BH+P<sub>20</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0.93</sub> and BH+Y<sub>10</sub>D<sub>20</sub>/N<sub>0.2</sub>, respectively) (Table 4). The  
422 variation of the nitrogen source (peptone or yeast extract) showed no significant difference in  
423 lipid production by *Rhodotorula RI*

424 Galafassi et al.[54], using glucose as a carbon source in the production of cellular  
425 lipids by *Rhodotorula graminis*, obtained 3.12 g L<sup>-1</sup> and 1.53 g L<sup>-1</sup> of cellular lipid, according  
426 to the variations in nitrogen concentration of 4 g L<sup>-1</sup> and 8 g L<sup>-1</sup> of yeast extract and peptone,  
427 respectively.

428

429

430 Table 4. Cell mass concentration, lipid production by *Rhodotorula RI* cultured in sugarcane  
 431 bagasse hydrolysate (BH) at 30°C, 130 rpm for 5 days.

	Lipid concentration (g L <sup>-1</sup> )	Accumulated lipid (%)	Biomass Concentration (g L <sup>-1</sup> )
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>0</sub> *	0.13±0.09 <sup>a**</sup>	1.94±0.95	9.71±0.03 <sup>a</sup>
Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub>	0.58±0.19 <sup>a</sup>	5.58±2.20	10.73±0.09 <sup>a</sup>
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>5</sub>	0.45±0.12 <sup>a</sup>	4.27±1.42	10.35±0.26 <sup>a</sup>
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>5</sub> / pH <sub>5,56</sub>	0.19±0.02 <sup>a</sup>	1.27±0.16	14.66±0.03 <sup>ac</sup>
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub>	0.82±0.01 <sup>ab</sup>	7.52±0.63	11.01±0.21 <sup>a</sup>
BH+Y <sub>10</sub> P <sub>30</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>5,31</sub>	0.85±0.13 <sup>ab</sup>	3.88±0.41	21.74±0.05 <sup>b</sup>
BH+Y <sub>20</sub> P <sub>20</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>5,11</sub>	0.84±0.19 <sup>ab</sup>	3.77±0.76	22.15±0.03 <sup>b</sup>
BH+P <sub>20</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>0,93</sub>	1,57±0,21 <sup>b</sup>	7,69±0,03	20,39±0,13 <sup>bc</sup>
BH+Y <sub>10</sub> D <sub>20</sub> / N <sub>0,2</sub>	1,40±0,22 <sup>b</sup>	10,50±2,04	13,57±0,06 <sup>a</sup>

432 \*BH, sugarcane bagasse hydrolysate; y, yeast extract; P, peptone; D, glucose; N, nitrogen; pH, value adjusted.  
 433 Other crops that do not have a pH sub-item, means that these crops have the same pH 6.62. And other crops that  
 434 do not have sub-item N, means that these crops have the same nitrogen concentration of 3.77 mg.L<sup>-1</sup>. These  
 435 letters followed by subscript numbers signify the dosage of the component used. Averages in columns followed  
 436 by different letters are significantly different by Tukey's test (p < 0.05). \*\*Means and standard deviations of  
 437 samples in triplicate.

438  
 439 However, the production of lipids in BH+Y<sub>10</sub>P<sub>20</sub>D<sub>0</sub> is lower than in the synthetic  
 440 medium containing glucose (Y<sub>10</sub>P<sub>20</sub>D<sub>20</sub>), which may be related to the presence of inhibitors in  
 441 the hydrolysate. In the BH used, this study showed 0.0367 ppm or 0.0000367 g L<sup>-1</sup> of acetic  
 442 acid. According to Pontawee et al. [53], several yeast strains can grow in the presence of  
 443 inhibitory compounds, but at concentrations above of 2.0 g L<sup>-1</sup> of acetic acid, may retard yeast  
 444 growth.

445 The inhibitory action of acetic acid depends on its non dissociated form, which  
 446 diffuses through the cytoplasm of the cell causing a reduction in intracellular pH, resulting in  
 447 uncoupled energy production and deficient transport of various nutrients and, consequently,  
 448 an increase on needing of ATP. Thus, the displacement of free energy, due to the high  
 449 concentration of acid, results in the cessation of growth or even cell death. This demonstrates  
 450 that tolerance to inhibitory compounds depended on the nature and concentration of the  
 451 compounds, as well as the nature of the microorganisms [53–55].



452 The biomass and lipid production of *Rhodotorula RI* achieved 9.71 g L<sup>-1</sup> and 1.94%,  
453 respectively, when the medium was composed of only sugarcane bagasse hydrolysate that  
454 contained a glucose and xylose ration of 2:1, indicating that the hydrolysate could be the  
455 substrate for microbial oil production [5].

456 The FTIR analysis of lipid extracted from *Rhodotorula RI* oilseed showed the presence  
457 of peak at 1460, 1372 and 1162 cm<sup>-1</sup> were attributed to CH<sub>2</sub> deformation, C-O-C stretching  
458 and CH<sub>3</sub> bending, respectively [9,56]. And peaks at 1089 cm<sup>-1</sup> is attributed to C-O stretching  
459 vibration of polysaccharides [57] and from 1113 to 1237 cm<sup>-1</sup> attributed to stretching C-O  
460 vibration of ester group [58,59]. The band at 1089 cm<sup>-1</sup> can be assigned to the combined  
461 carboxylic acid group  $\nu$ (C-O) and inorganic sulfates (SO<sub>4</sub>) with the contribution of  $\nu$ (C-O-C)  
462 and  $\nu$ (Si-O) [60]. The 970 cm<sup>-1</sup> peak corresponding to the C-O stretching of the  
463 carbohydrates. The presence of a trace carbohydrate in the extracted microbial lipid has been  
464 suggested as a common feature of most single-cell oils. With vegetable oils, all the peaks  
465 mentioned confirm that the oil produced can be a potential feedstock for biodiesel production  
466 [9].

467 Biodiesel characteristics are mainly affected by fatty acid methyl esters (FAMES)  
468 composition. The hydrolysate of non-detoxified sugarcane bagasse used for the production of  
469 cellular oil by *Rhodotorula RI* presented as main fatty acids, Elaidic (C18:1n9t, 61.99%),  
470 Palmitic (C16:0, 15.66%), Stearate (C18:0, 10.22%), Linoleic (C18:2n6c, 3.75%),  
471 Tetracosanoic (C24:0, 2.65%), Palmitelaidate (C16:1, 2.05%), Docosanoic (C22:0, 1.16%),  
472 tetradecanoate or myristic (C14:0, 0.77%), Eicosanoic (C20:0, 0.54%) and others. The main  
473 fatty acids present in the biodiesel produced in this study are also reported in other studies  
474 [2,4,61].

475 The properties of biodiesel are dependent on the structure of its fatty esters. A higher  
476 saturated FAME content gives the biodiesel a high cetane number, oxidative stability, and  
477 helps a good cold start properties with reduced smoke formation. The presence of  
478 monounsaturated fatty acids is important, as it gives the biodiesel properties such as cold  
479 ignition, flow and storage stability [63,64]. The lipid produced has most of saturated fatty  
480 acids (Palmitic and Stearate) [4] and monounsaturated (Elaidic) [62].

481 So the lipids of *Rhodotorula RI* contain mainly long-chain fatty acids with 16 and 18  
482 carbon atoms which is similar to the composition of vegetable oils currently used as  
483 feedstock for biodiesel production [7,53], suggesting that these lipids are suitable feedstock for  
484 biodiesel production.

485

## 486 Conclusion

487 Biotechnological processes using fungi and yeast for bioconversion of a  
488 lignocellulosic material as sugarcane bagasse into biodiesel has been promised very good  
489 results. Also, this biotechnique showed high potential for biodiesel production. The  
490 hydrolysis of lignocellulosic materials such as sugarcane bagasse can be maximized by using  
491 low dosages of commercial enzyme in conjunction with in-house crude enzymes of T.SG2. It  
492 seems that the pretreated waste of sugarcane processing has potential for biodiesel production  
493 with the biotechnology process applied in this study; but requires further studies to optimize  
494 yield. Interestingly, the main fatty acids were shown as long chain fatty acids (C16 and C18)  
495 which can be effectively converted into biodiesel as established in the case of plant based  
496 vegetable oil.

497

## 498 Acknowledgements

499 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
500 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and Brazilian National Council for

501 Scientific and Technological Development (CNPq) and Research Support Foundation of the  
 502 State of Rio Grande do Sul (FAPERGS). *Trichoderma* SG2 (US Patent 9,617,574 B2) and  
 503 *Rhodotorula* R1 were received from the Bioprocessing and Biofuel Research Lab, Auburn  
 504 University at Montgomery. Benedict Okeke received US Scholar Fulbright award. Thanks to  
 505 George Jackson de Moraes Rocha from the National Center for Research in Energy and  
 506 Materials (CNPEM) for the pretreated sugarcane bagasse  
 507  
 508

## 509 References

510

- 511 [1] L. Hadhoum, F.Z. Aklouche, K. Loubar, M. Tazerout, Experimental investigation of performance ,  
 512 emission and combustion characteristics of olive mill wastewater biofuel blends fuelled CI engine, *Fuel*.  
 513 291 (2021) 120199. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120199>.
- 514 [2] T.M. Jiru, L. Steyn, C. Pohl, D. Abate, Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula*  
 515 *kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock, *Chem. Cent. J.* 12  
 516 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0457-7>.
- 517 [3] L. Zhang, K.C. Loh, A. Kuroki, Y. Dai, Y.W. Tong, Microbial biodiesel production from industrial  
 518 organic wastes by oleaginous microorganisms: Current status and prospects, *J. Hazard. Mater.* 402  
 519 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123543>.
- 520 [4] G. Singh, S. Sinha, K.K. Kumar, N.A. Gaur, K.K. Bandyopadhyay, D. Paul, High density cultivation of  
 521 oleaginous yeast isolates in ‘mandi’ waste for enhanced lipid production using sugarcane molasses as  
 522 feed, *Fuel*. 276 (2020) 118073. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118073>.
- 523 [5] Z. Miao, X. Tian, W. Liang, Y. He, G. Wang, Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid  
 524 by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production, *Renew. Energy*. 161  
 525 (2020) 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.007>.
- 526 [6] R. Poontawee, W. Yongmanitchai, S. Limtong, Efficient oleaginous yeasts for lipid production from  
 527 lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid  
 528 production, *Process Biochem.* 53 (2017) 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.013>.
- 529 [7] M. Li, G.L. Liu, Z. Chi, Z.M. Chi, Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by  
 530 marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a, *Biomass and Bioenergy*. 34 (2010) 101–107.  
 531 <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.10.005>.
- 532 [8] L. Chen, Y. Zhang, G.L. Liu, Z. Chi, Z. Hu, Z.M. Chi, Cellular lipid production by the fatty acid  
 533 synthase-duplicated *Lipomyces kononenkoae* BF1S57 strain for biodiesel making, *Renew. Energy*. 151  
 534 (2020) 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.11.074>.
- 535 [9] M. Guerfali, I. Ayadi, H.E. Sassi, A. Belhassen, A. Gargouri, H. Belghith, Biodiesel-derived crude  
 536 glycerol as alternative feedstock for single cell oil production by the oleaginous yeast *Candida*  
 537 *viswanathii* Y-E4, *Ind. Crops Prod.* 145 (2020) 112103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112103>.
- 538 [10] R.V. Sreeharsha, S.V. Mohan, Obscure yet Promising Oleaginous Yeasts for Fuel and Chemical  
 539 Production, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.004>.
- 540 [11] Z. Liu, E. Shi, F. Ma, K. Jiang, An integrated biorefinery process for co-production of xylose and  
 541 glucose using maleic acid as efficient catalyst, *Bioresour. Technol.* 325 (2021) 124698.  
 542 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124698>.
- 543 [12] J.Q. Zhu, W.C. Li, L. Qin, X. Zhao, S. Chen, H. Liu, Z.H. Liu, X. Zhou, X. Li, B.Z. Li, Y.J. Yuan,  
 544 Stepwise pretreatment of aqueous ammonia and ethylenediamine improve enzymatic hydrolysis of corn  
 545 stover, *Ind. Crops Prod.* 124 (2018) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.072>.
- 546 [13] D.W.K. Chin, S. Lim, Y.L. Pang, C.H. Lim, K.M. Lee, Two-staged acid hydrolysis on ethylene glycol  
 547 pretreated degraded oil palm empty fruit bunch for sugar based substrate recovery, *Bioresour. Technol.*  
 548 292 (2019) 121967. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121967>.
- 549 [14] L.J. Jönsson, C. Martín, Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and  
 550 strategies for minimizing their effects, *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 103–112.

- 551 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>.
- 552 [15] H. Zhang, W. Wei, J. Zhang, S. Huang, J. Xie, Biotechnology for Biofuels Enhancing enzymatic  
553 saccharification of sugarcane bagasse by combinatorial pretreatment and Tween 80, *Biotechnol.*  
554 *Biofuels*. (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1313-7>.
- 555 [16] K.K. Brar, M.C. Espirito Santo, V.O.A. Pellegrini, E.R. deAzevedo, F.E.C. Guimaraes, I. Polikarpov,  
556 B.S. Chadha, Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse  
557 and understanding the structural changes leading to improved saccharification, *Biomass and Bioenergy*.  
558 139 (2020) 105639. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105639>.
- 559 [17] K. Briwani, H.S. Oberoi, P. V. Vadlani, Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture  
560 solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran, *Process Biochem.* 45 (2010)  
561 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.015>.
- 562 [18] B. Sharma, C. Larroche, C.G. Dussap, Comprehensive assessment of 2G bioethanol production,  
563 *Bioresour. Technol.* 313 (2020) 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>.
- 564 [19] B.C. Okeke, Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High  $\beta$ -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from  
565 Decaying Biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174 (2014) 1581–1598. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1121-x>.
- 566
- 567 [20] Focht, D. D. (1994). In R. W. Weaver et al. (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 2—Microbiological*  
568 *and biochemical properties*. Soil Science Society of America (Vol. 5, pp. 407–426). Madison: SSSA
- 569 [21] B.C. Okeke, J. Lu, Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for  
570 bioprocessing of cellulose and hemicelluloses, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163 (2011) 869–881.  
571 <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9091-0>.
- 572 [22] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31  
573 (1959) 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- 574 [23] C. Ctec, Cellulosic ethanol Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic, (n.d.) 1–8.
- 575 [24] M. Guerfali, I. Ayadi, A. Belhassen, A. Gargouri, H. Belghith, Single cell oil production by  
576 *Trichosporon cutaneum* and lignocellulosic residues bioconversion for biodiesel synthesis, *Process Saf.*  
577 *Environ. Prot.* 113 (2018) 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.11.002>.
- 578 [25] A.M. Kot, S. Błażejczak, M. Kieliszczak, I. Gientka, J. Bryś, Simultaneous Production of Lipids and  
579 Carotenoids by the Red Yeast *Rhodotorula* from Waste Glycerol Fraction and Potato Wastewater, *Appl.*  
580 *Biochem. Biotechnol.* 189 (2019) 589–607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>.
- 581 [26] V. Ananthi, G. Siva Prakash, S.W. Chang, B. Ravindran, D.D. Nguyen, D.V.N. Vo, D.D. La, Q.V. Bach,  
582 J.W.C. Wong, S. Kumar Gupta, A. Selvaraj, A. Arun, Enhanced microbial biodiesel production from  
583 lignocellulosic hydrolysates using yeast isolates, *Fuel*. 256 (2019) 115932.  
584 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115932>.
- 585 [27] D. Samios, F. Pedrotti, A. Nicolau, Q.B. Reiznautt, D.D. Martini, F.M. Dalcin, A Transesterification  
586 Double Step Process — TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides, *Fuel Process.*  
587 *Technol.* 90 (2009) 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2008.12.011>.
- 588 [28] C.T. Rockembach, D. Dias, B.M. Vieira, M. Ritter, M.A.Z. Dos Santos, D.M. De Oliveira, L.A.M.  
589 Fontoura, M.G. Crizel, M.F. Mesko, V.O.B. Dos Santos, C.M.P. De Pereira, Synthesis of biodiesel from  
590 grape seed oil using ultrasound irradiation, *Rev. Virtual Quim.* 6 (2014) 884–897.  
591 <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140054>.
- 592 [29] U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Dielh, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, **2008**, Elsevier B. V.,  
593 Chapter 1 (Quantitative NMR in the solution state NMR – F. Malz), <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53173-5.X0001-7>.
- 594
- 595 [30] K.F. Lamounier, P.O. Rodrigues, D. Pasquini, A.S. Santos, M.A. Baffi, EFFECTS OF THE INCREASE  
596 IN SUBSTRATE LOAD AND HYDROLYSIS TIME IN THE EFEITOS DO AUMENTO DA CARGA  
597 DO SUBSTRATO E DO TEMPO DE HIDRÓLISE NA SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-  
598 DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE ETANOL The search for renewable energy sources has increased i,  
599 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.15628/holos.2020.9485>.
- 600 [31] K. Raj, C. Krishnan, Improved co-production of ethanol and xylitol from low-temperature aqueous  
601 ammonia pretreated sugarcane bagasse using two-stage high solids enzymatic hydrolysis and *Candida*  
602 *tropicalis*, *Renew. Energy*. 153 (2020) 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.042>.

- 603 [32] P. da S. Delabona, J. Cota, Z.B. Hoffmam, D.A.A. Paixão, C.S. Farinas, J.P.L.F. Cairo, D.J. Lima, F.M.  
604 Squina, R. Ruller, J.G. da C. Pradella, Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum*  
605 P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with  
606 pectinase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase, *Bioresour. Technol.* 131 (2013) 500–507.  
607 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.105>.
- 608 [33] A.C. Rodrigues, M.Ø. Haven, J. Lindedam, C. Felby, M. Gama, Celluclast and Cellic® CTec2:  
609 Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by  
610 alkaline washing, *Enzyme Microb. Technol.* 79–80 (2015) 70–77.  
611 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.019>.
- 612 [34] D. de F. Passos, N. Pereira, A.M. de Castro, A comparative review of recent advances in cellulases  
613 production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose  
614 deconstruction, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 14 (2018) 60–66.  
615 <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>.
- 616 [35] Y. Xue, H. Jameel, S. Park, Strategies to recycle enzymes and their impact on enzymatic hydrolysis for  
617 bioethanol production, *BioResources.* 7 (2012) 602–615. <https://doi.org/10.15376/biores.7.1.0602-0615>.
- 618 [36] L. Zhu, J.P. O'Dwyer, V.S. Chang, C.B. Granda, M.T. Holtzapple, Structural features affecting biomass  
619 enzymatic digestibility, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3817–3828.  
620 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.033>.
- 621 [37] H. Chen, S. Jin, Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose,  
622 *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1430–1432. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.027>.
- 623 [38] A. Bala, B. Singh, Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and  
624 saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production, *Renew. Energy.* 130 (2019) 12–24.  
625 <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.033>.
- 626 [39] Y. Gao, J. Xu, Z. Yuan, Y. Zhang, C. Liang, Y. Liu, Ethanol Production from High Solids Loading of  
627 Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse with an SSF Process, *BioResources.* 9 (2014) 3466–3479.  
628 <https://doi.org/10.15376/biores.9.2.3466-3479>.
- 629 [40] K.M. Roberts, D.M. Lavenson, E.J. Tozzi, M.J. McCarthy, T. Jeoh, The effects of water interactions in  
630 cellulose suspensions on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings, *Cellulose.*  
631 18 (2011) 759–773. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9509-z>.
- 632 [41] J. Yang, X. Zhang, Q. Yong, S. Yu, Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of  
633 steam-exploded corn stover, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4930–4935.  
634 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.079>.
- 635 [42] Y. Wu, L. Jiang, Y. Lin, L. Qian, F. Xu, X. Lang, S. Fan, Z. Zhao, H. Li, Novel crude glycerol  
636 pretreatment for selective saccharification of sugarcane bagasse via fast pyrolysis, *Bioresour. Technol.*  
637 294 (2019) 122094. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122094>.
- 638 [43] P. Binod, E. Gnansounou, R. Sindhu, A. Pandey, Enzymes for second generation biofuels: Recent  
639 developments and future perspectives, *Bioresour. Technol. Reports.* 5 (2019) 317–325.  
640 <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005>.
- 641 [44] W.H. Chen, Y.J. Tu, H.K. Sheen, Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of  
642 dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating, *Appl. Energy.* 88 (2011) 2726–2734.  
643 <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.027>.
- 644 [45] F.C. Barbosa, M. Martins, L.B. Brenelli, F.A. Ferrari, M.B.S. Forte, S.C. Rabelo, T.T. Franco, R.  
645 Goldbeck, Screening of potential endoglucanases, hydrolysis conditions and different sugarcane straws  
646 pretreatments for cello-oligosaccharides production, *Bioresour. Technol.* 316 (2020) 123918.  
647 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123918>.
- 648 [46] V.Z. Ong, T.Y. Wu, K.K.L. Chu, W.Y. Sun, K.P.Y. Shak, A combined pretreatment with ultrasound-  
649 assisted alkaline solution and aqueous deep eutectic solvent for enhancing delignification and enzymatic  
650 hydrolysis from oil palm fronds, *Ind. Crops Prod.* 160 (2021) 112974.  
651 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112974>.
- 652 [47] W.B. Huang, A.C. Wachemo, H.R. Yuan, X.J. Li, Modification of corn stover for improving  
653 biodegradability and anaerobic digestion performance by *Ceriporiopsis subvermispota*, *Bioresour.*  
654 *Technol.* 283 (2019) 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.035>.

- 655 [48] F.P. Marques, A.K.L. Soares, D. Lomonaco, L.M. Alexandre e Silva, S.T. Santaella, M. de Freitas Rosa,  
656 R.C. Leitão, Steam explosion pretreatment improves acetic acid organosolv delignification of oil palm  
657 mesocarp fibers and sugarcane bagasse, *Int. J. Biol. Macromol.* 175 (2021) 304–312.  
658 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.174>.
- 659 [49] Q. Ba, S. Truong, D. Khanh, T. Du, D. Minh, Cellulose-based aerogels from sugarcane bagasse for oil  
660 spill-cleaning and heat insulation applications, *Carbohydr. Polym.* 228 (2020) 115365.  
661 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115365>.
- 662 [50] M. Wang, D. Zhou, Y. Wang, S. Wei, W. Yang, M. Kuang, L. Ma, D. Fang, S. Xu, S. Du, Bioethanol  
663 production from cotton stalk : A comparative study of various pretreatments, *Fuel.* 184 (2016) 527–532.  
664 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.07.061>.
- 665 [51] M.C. do Espírito Santo, E.B. Cardoso, F.E.G. Guimaraes, E.R. deAzevedo, G.P. da Cunha, E.H.  
666 Novotny, V. de O.A. Pellegrini, A.K. Chandel, M.H.L. Silveira, I. Polikarpov, Multifaceted  
667 characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to  
668 distinct enzymatic hydrolysis yields, *Ind. Crops Prod.* 139 (2019) 111542.  
669 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111542>.
- 670 [52] M.G. Gomes, L.V.A. Gurgel, M.A. Baffi, D. Pasquini, Pretreatment of sugarcane bagasse using citric  
671 acid and its use in enzymatic hydrolysis, *Renew. Energy.* 157 (2020) 332–341.  
672 <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.002>.
- 673 [53] R. Poontawee, W. Yongmanitchai, S. Limtong, Lipid production from a mixture of sugarcane top  
674 hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus*  
675 *fluvialis*, *Process Biochem.* 66 (2018) 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.020>.
- 676 [54] S. Galafassi, D. Cucchetti, F. Pizza, G. Franzosi, D. Bianchi, C. Compagno, Lipid production for second  
677 generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*, *Bioresour. Technol.* 111 (2012) 398–  
678 403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>.
- 679 [55] M.C.A. Xavier, A.L. V Coradini, A.C. Deckmann, T.T. Franco, Lipid production from hemicellulose  
680 hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors,  
681 *Biochem. Eng. J.* 118 (2017) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.007>.
- 682 [56] J. Fu, L. Song, J. Guan, C. Sun, D. Zhou, B. Zhu, Encapsulation of Antarctic krill oil in yeast cell  
683 microcarriers: Evaluation of oxidative stability and in vitro release, *Food Chem.* 338 (2021) 128089.  
684 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128089>.
- 685 [57] K.A. Ani, C.M. Agu, C. Esonye, M.C. Menkiti, Investigations on the characterizations, optimization and  
686 effectiveness of goat manure compost in crude oil biodegradation, *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* 4  
687 (2021) 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100120>.
- 688 [58] A.B. Fadhil, E.T.B. Al-Tikrity, M.A. Albadree, Transesterification of a novel feedstock, *Cyprinus carpio*  
689 fish oil: Influence of co-solvent and characterization of biodiesel, *Fuel.* 162 (2015) 215–223.  
690 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.09.001>.
- 691 [59] A.B. Fadhil, W.S. Abdulahad, Transesterification of mustard (*Brassica nigra*) seed oil with ethanol:  
692 Purification of the crude ethyl ester with activated carbon produced from de-oiled cake, *Energy Convers.*  
693 *Manag.* 77 (2014) 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.10.008>.
- 694 [60] Z. Kisová, J. Pavlović, L. Šefčiková, M. Bučková, A. Puškárová, L. Kraková, A.O. Šišková, A.  
695 Kleinová, Z. Machatová, D. Pangallo, Removal of overpainting from an historical painting of the XVIII  
696 Century: A yeast enzymatic approach, *J. Biotechnol.* 335 (2021) 55–64.  
697 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.008>.
- 698 [61] S. Bandhu, N. Bansal, D. Dasgupta, V. Junghare, A. Sidana, G. Kalyan, S. Hazra, D. Ghosh,  
699 Overproduction of single cell oil from xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate by an engineered  
700 oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* I IPL32, *Fuel.* 254 (2019) 115653.  
701 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115653>.
- 702 [62] C.A. Popovich, M. Pistonesi, P. Hegel, D. Constenla, G.B. Bielsa, L.A. Martín, M.C. Damiani, P.I.  
703 Leonardi, Unconventional alternative biofuels: Quality assessment of biodiesel and its blends from  
704 marine diatom *Navicula cincta*, *Algal Res.* 39 (2019) 101438.  
705 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101438>.
- 706 [63] M. Khot, D. Ghosh, Lipids of *Rhodotorula mucilaginosa* I IPL32 with biodiesel potential: Oil yield, fatty  
707 acid profile, fuel properties, *J. Basic Microbiol.* 57 (2017) 345–352.

708 <https://doi.org/10.1002/jobm.201600618>.

709 [64] I. Ayadi, H. Belghith, A. Gargouri, M. Guerfali, Utilization of Wheat Bran Acid Hydrolysate by  
710 *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for Microbial Lipid Production as Feedstock for Biodiesel Synthesis,  
711 *Biomed Res. Int.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/3213521>.

712

## 6 Conclusões

A taxa de sólidos é um fator de grande influência na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar explodida a vapor por enzima celulolítico e xilanolítico produzidas por *Trichoderma* SG2.

O estudo demonstrou que é possível maximizar o uso de enzimas celulolítico e xilanolítico produzidas por *Trichoderma* SG2 na hidrólise de matérias lignocelulósicas. A enzima bruta diluída a 50% com a enzima produzida por *Trichoderma* SG2 apresenta alta eficiência na degradação de celulose. Além disso, a alta concentração de açúcares na fase líquida é um fator de interferência no processo de hidrólise enzimática, o qual se obteve maior quantidade de açúcares redutores totais utilizando como metodologia de sacarificação de múltiplos estágios com separação das frações líquidas e sólidas e com adição de nova enzima não diluída.

Os lipídeos produzidos por *Rhodotorula* espécie R1, é composto principalmente de ácidos graxos de cadeia longa, como ácido Elaidic, Palmítico e Estearato que podem ser efetivamente convertidos em biodiesel conforme estabelecido no caso de óleo vegetal à base de plantas.

Os processos biotecnológicos utilizando o fungo celulolítico *Trichoderma* SG2 para a quebra inicial da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar, para posterior produção de bioóleo pela levedura *Rhodotorula* R1 são potenciais mecanismos de transformação biotecnológica de biomassa à biodiesel, e podem ser uma alternativa interessante para a substituição parcial ou total do Petróleo em um futuro muito próximo.

Porém, novos estudos ainda são necessários, principalmente no aprimoramento de enzimas com qualidades robustas, aumentar a produção de enzimas otimizando meios e melhorar a reutilização.

Para consolidar a produção de biodiesel microbiano é importante determinar os melhores parâmetros para o acúmulo de lipídeos. A modificação da parede celular apresenta uma abordagem potencialmente promissora para melhorar tanto a colheita de biomassa de levedura oleaginosa quanto a suscetibilidade celular à lise.

## Referências

ANANTHI, V. *et al.* Enhanced microbial biodiesel production from lignocellulosic hydrolysates using yeast isolates. **Fuel**, v. 256, p. 115932, Mar. 2019.

ANI, Kingsely Amechi *et al.* Investigations on the characterizations, optimization and effectiveness of goat manure compost in crude oil biodegradation. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 100120, Jan. 2021.

Anschau, Andréia. **Produção de lipídeos por *Lipomyces starkeyi* estratégia para obtenção de alta densidade celular a partir de xilose a glicose**. 2014. Tese (doutorado engenharia química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

ANU *et al.* Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. **Renewable Energy**, v. 160, p. 1228–1252, July. 2020.

AYADI, Ines *et al.* Utilization of Wheat Bran Acid Hydrolysate by *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for Microbial Lipid Production as Feedstock for Biodiesel Synthesis. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1-12. 2019.

BALA, Anju; SINGH, Bijender. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 130, p. 12–24, 2019.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 6 Sept. 2011.

BANDHU, Sheetal *et al.* Overproduction of single cell oil from xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate by an engineered oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IIPL32. **Fuel**, v. 254, n. 115653, 2019.

BARBOSA, Fernando César *et al.* Screening of potential endoglucanases, hydrolysis conditions and different sugarcane straws pretreatments for cello-oligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 316, n. 123918, p. 1-8, July. 2020.



BINOD, Parameswaran *et al.* Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v.5, p. 317-325, July. 2019.

BÓRAWSKI, P. *et al.* Development of renewable energy sources market and biofuels in The European Union. *Journal of Cleaner Production*, v. 228, p. 467–484, 2019.

BRAR, Kamalpreet Kaur *et al.* Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 139, p. 105639, June. 2020.

BRAR, K. K *et al.* Potential of oleaginous yeast *Trichosporon sp.*, for conversion of sugarcane bagasse hydrolysate into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 161-168, Mar. 2017.

BRAUNWALD, Teresa. *et al.* Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6581–6588, 2013.

BRIJWANI, Khushal Brijwani; OBEROI, Harinder Singh; VADLANI, Praveen V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120–128, 2010.

CANILHA, Larissa *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15. 2012.

CERRI, C. E. P. *et al.* Assessing the greenhouse gas emissions of Brazilian soybean biodiesel production. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–14, 2017.

CHEN, Hongzhang; JIN, Shengying. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1430–1432, 2006.

CHEN, Lu *et al.* Cellular lipid production by the fatty acid synthase-duplicated *Lipomyces kononenkoae* BF1S57 strain for biodiesel making. **Renewable Energy**, v. 151, p. 707–714, 2020.

CHEN, Wei-Hsin Chena; TU, Yi-Jian; SHEEN, Heng-Kuang Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, n. 8, p. 2726–2734, 2011.

CHIN, Danny Wei Kit *et al.* Two-staged acid hydrolysis on ethylene glycol pretreated degraded oil palm empty fruit bunch for sugar based substrate recovery. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121967, June. 2019.

COLOMBO, Kamila *et al.* Production of biodiesel from Soybean Oil and Methanol, catalyzed by calcium oxide in a recycle reactor. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 19–25, 2019.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Brasília, v.8, SAFRA 2021/22 N.3, 2021. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: Acesso em: 02 Fev.2022.

CTEC, C. Cellulosic ethanol Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. p. 1–8, [s.d.].

DELABONA, Priscila da Silva *et al.* Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500–507, 2013.

DONG, Tao *et al.* Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production : A critical review. **Applied Energy**, v. 177, p. 879–895, 2016.

DORNI, Charles *et al.* Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. **Food Chemistry**, v. 238, p. 9–15, 2018.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Análise de Conjuntura dos biocombustíveis: ano base 2019, 2020. Disponível em:<<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/analise-de-conjuntura-dos-biocombustiveis>>. Acesso em: Acesso em: 11 Março.2022.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Relatório Síntese 2021: ano base 2020,2021a Disponível em:< [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-601/topico-588/BEN\\_S%C3%ADntese\\_2021\\_PT.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-601/topico-588/BEN_S%C3%ADntese_2021_PT.pdf)>. Acesso em: Acesso em: 11 Março.2022.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Atlas da Eficiência Energética no Brasil: Relatório de Indicadores, 2021b. Disponível em: < [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-651/Atlas2021\\_PT\\_2022\\_02\\_04.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-651/Atlas2021_PT_2022_02_04.pdf)>. Acesso em: 11 Março.2022.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Análise de Conjuntura dos biocombustíveis: ano base 2020, 2021c. Disponível em: < <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/analise-de-conjuntura-dos-biocombustiveis>>. Acesso em: 11 Março.2022.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Impacto na saúde humana pelo uso de biocombustíveis na Região Metropolitana de São Paulo: Nota Técnica, 2021d. Disponível em: < <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/impacto-na-saude-humana-pelo-uso-de-biocombustiveis-na-regiao-metropolitana-de-sao-paulo>>. Acesso em: 11 Março.2022.

ESPÍRITO SANTO, Melissa Cristina do *et al.* Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. 111542, 2019.

EZEILO, Uchenna R *et al.* Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 243, p. 206–217, 2019.

FADHIL, Abdelrahman B; ABDULAHAD, Waseem S. Transesterification of mustard (*Brassica nigra*) seed oil with ethanol: Purification of the crude ethyl ester with activated carbon produced from de-oiled cake. **Energy Conversion and Management**, v. 77, p. 495–503, 2014.

FADHIL, Abdelrahman B; AL-TIKRITY, Emaad T.B; ALBADREE, Muhammed A. Transesterification of a novel feedstock, *Cyprinus carpio* fish oil: Influence of co-solvent and characterization of biodiesel. **Fuel**, v. 162, p. 215–223, 2015.

FARIA, Nuno Torres; MARQUES, Susana; FERREIRA, Frederico Castelo; FONSECA, César. Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces* spp using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates. **New BIOTECHNOLOGY**, v. 49, p. 137-143, 2019.

FARIA, Syd Pereira *et al.* Production of cellulases and xylanases by *Humicola grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 158, n. 112968, 2020.

FERREIRA, Adriana Dilon. **Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais**. 2016. Tese (Doutor em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena Adriana, Universidade de São Paulo, Lorena-, 2016.

FERREIRA, Verônica. **Produção de  $\beta$ -glucosidase em *saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. Tese (Doutor em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Focht, D. D. (1994). In R. W. Weaver et al. (Eds.), **Methods of soil analysis, Part 2—Microbiological and biochemical properties**. Soil Science Society of America (Vol. 5, pp. 407–426). Madison: SSSA.

FOTEINIS, Spyros *et al.* Used-cooking-oil biodiesel: Life cycle assessment and comparison with first- and third-generation biofuel. **Renewable Energy**, v. 153, p. 588–600, Feb. 2020.

FU, Jingjing *et al.* Encapsulation of Antarctic krill oil in yeast cell microcarriers: Evaluation of oxidative stability and in vitro release. **Food Chemistry**, v. 338, n. 128089, Aug. 2021.

GALAFASSI, Silvia *et al.* Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 398–403, Feb. 2012.

GAO, Yueshu *et al.* Ethanol Production from High Solids Loading of Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse with an SSF Process. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 3466–3479, 2014.

GARCILASSO, Vanessa Pecora. **Análise entre processos e matérias-primas para a produção de biodiesel**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência) - Instituto de Energia e Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GOMES, Michelle Garcia *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 157, p. 332–341, 2020.

GUERFALI, Mohamed *et al.* Biodiesel-derived crude glycerol as alternative feedstock for single cell oil production by the oleaginous yeast *Candida viswanathii* Y-E4. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112103, Jan. 2020.

GUERFALI, Mohamed *et al.* Single cell oil production by *Trichosporon cutaneum* and lignocellulosic residues bioconversion for biodiesel synthesis. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 113, p. 292–304, 2018.

HADHOUM, Loubna. *et al.* Experimental investigation of performance, emission and combustion characteristics of olive mill wastewater biofuel blends fuelled CI engine. **Fuel**, v. 291, p. 120199, Feb. 2021.

HÁJEK, Martin; VÁVRA, Aleš; PAZ CARMONA, Héctor de; KOCÍK, Jaroslav. The Catalysed Transformation of Vegetable Oils or Animal Fats to Biofuels and Bio-Lubricants: A Review. **Catalysts**, v. 11, n.1118, p. 1–30, 2021.

HALDAR, Dibyajyoti; PURKAIT, Mihir Kumar. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, Oct. 2020.

HAN, Yu Tong *et al.* Analysis of enzymolysis process kinetics and estimation of the resource conversion efficiency to corn cobs with alkali soaking, water and acid steam explosion pretreatments. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 391–394, June. 2018.

HE, Liwen *et al.* Combination of steam explosion pretreatment and anaerobic alkalization treatment to improve enzymatic hydrolysis of *Hippophae rhamnoides*. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121693, June. 2019.

HEWAVITHARANA, Geeth G *et al.* Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 6865–6875, July. 2020.

HUANG, WenBo *et al.* Modification of corn stover for improving biodegradability and anaerobic digestion performance by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Bioresource Technology**, v. 283, p. 76–85, 2019.

International Energy Agency (IEA). Analysis and forecast to 2025. Disponível em:< <https://www.iea.org/fuels-and-technologies/renewables>>. Acesso em: 11 Março 2022.

JIRU, Tamene Milkessa *et al.* Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 91, p. 1–7, 2018.

JIRU, Tamene Milkessa *et al.* Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. **3 Biotech**, v. 7, n. 145, p. 1–11, June. 2017.

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

KARATAY, Sevgi Ertugrul; DÖNMEZ, Gönül. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7988-7990, June. 2010.

KAYA, Canan. *et al.* Methyl ester of peanut (*Arachis hypogea L*) seed oil as a potential feedstock for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1257–1260, Nov. 2009.

KHOT, Mahesh, *et al.* Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. **Fuel**, v. 259, n. May 2019, p. 116292, 2020.

KHOT, Mahesh; GHOSH, Debashish. Lipids of *Rhodotorula mucilaginosa* IIP32 with biodiesel potential: Oil yield, fatty acid profile, fuel properties. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, p. 345–352, 2017.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 803–807, Aug. 2011.

KISOVÁ, Zuzana *et al.* Removal of overpainting from an historical painting of the XVIII Century: A yeast enzymatic approach. **Journal of Biotechnology**, v. 335, p. 55–64, 2021.

KOT, Anna M *et al.* Simultaneous Production of Lipids and Carotenoids by the Red Yeast *Rhodotorula* from Waste Glycerol Fraction and Potato Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 2, p. 589–607, 2019.

LAMOUNIER, K. F *et al.* Effects of the increase in substrate load and hydrolysis time in the saccharification of sugarcane bagasse and ethanol production. **HOLOS**, v. 36, n. 6, p. 1–13, 2020.

LEONG, Wai-Hong *et al.* Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 950-961, Apr. 2018.

LEUNG, Dennis Y.C.; WU, Xuan; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, April. 2010.

LI, Mei *et al.* Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101–107, 2010.

LIMAYEM, Alya; RICKE, Steven C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449–467, Apr. 2012.

LIU, Zhenghui *et al.* An integrated biorefinery process for co-production of xylose and glucose using maleic acid as efficient catalyst. **Bioresource Technology**, v. 325, n. 481, p. 124698, 2021.

LUCAS, Rosymar Coutinho *et al.* The profile secretion of *Aspergillus clavatus*: Different pre-treatments of sugarcane bagasse distinctly induces holocellulases for the lignocellulosic biomass conversion into sugar. **Renewable Energy**, v. 165, p. 748-757, 2021.

ŁUKAJTIS, Rafał *et al.* Comparison and optimization of saccharification conditions of alkaline pre-Treated triticale straw for acid and enzymatic hydrolysis followed by ethanol fermentation. **Energies**, v. 11, n. 639, p. 1-24, Mar. 2018.

LYND, Lee R. *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, Sept. 2002.

MADANI, M.; ENSHAEIEH, M.; ABDOLI, A. Single cell oil and its application for biodiesel production. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 111, p. 747–756, 2017.

MAFA, Mpho S; PLETSCHE, Brett I; MALGAS, Samkelo. Defining the frontiers of synergism between cellulolytic enzymes for improved hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. **Catalysts**, v. 11, n. 1343, p. 1–19, Nov. 2021.

MARQUES, Francisco Pereira *et al.* Steam explosion pretreatment improves acetic acid organosolv delignification of oil palm mesocarp fibers and sugarcane bagasse. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 304–312, 2021.

MARTÍNEZ-PACHECO, Mauro M *et al.* Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 4, p. 328–338, 2020.

MAT, Nawi Nazmi *et al.* Prediction of Sugarcane Quality Parameters Using Visible-shortwave Near Infrared Spectroradiometer. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 136–143, 2014.

MEGHANA, Munagala; SHASTRI, Yogendra. Sustainable valorization of sugar industry waste: Status, opportunities, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122929, Jan. 2020.

MIAO, Zhengang. *et al.* Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 161, p. 91–97, July. 2020.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORAIS, Lizz Kezzy *et al.* Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar. n. 200, 38 p. 2015.

MOREIRA, B. R. A. *et al.* Classifying Hybrids of Energy Cane for Production of Bioethanol and Cogeneration of Biomass-Based Electricity by Principal Component Analysis-Linked Fuzzy C-Means Clustering Algorithm. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 14, p. 246–253, Aug. 2019.



MOYA, R.; TENORIO, C.; OPORTO, G. Short rotation wood crops in Latin American: A review on status and potential uses as biofuel. **Energies**, v. 12, n. 4, 2019

MUFUTAU OPEYEMI, Bello. Path to sustainable energy consumption: The possibility of substituting renewable energy for non-renewable energy. **Energy**, v. 228, p. 120519, 2021.

NAIK, S. N. *et al.* Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184–194, Feb. 2016.

OKEKE, Benedict C; LU, Jue. Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 7, p. 869–881, 2011.

OKEKE, Benedict C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High  $\beta$ -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 1581–1598, Aug. 2014.

OLIVEIRA, Anderson Ramos *et al.* Influência de lâminas de irrigação nas características tecnológicas da cana-de-açúcar. **Embrapa Semiárido**, p. 22, 2016.

ONG, Victor Zhenquan *et al.* A combined pretreatment with ultrasound-assisted alkaline solution and aqueous deep eutectic solvent for enhancing delignification and enzymatic hydrolysis from oil palm fronds. **Industrial Crops and Products**, v. 160, n. 112974, p. 1–11, Sept. 2021.

PASSOS, Douglas de França; JR PEREIRA, Nei; CASTRO, Aline Machado de. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 2018.

POONTAWEE, R.; YONGMANITCHAI, W.; LIMTONG, S. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 44–60, 2017.

POONTAWEE, Rujiralai; YONGMANITCHAI, Wichien; LIMTONG, Savitree. Lipid production from a mixture of sugarcane top hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus fluvialis*. **Process Biochemistry**, v. 66, n. Nov. 2017, p. 150–161, 2018.

POPOVICH, C. A. *et al.* Unconventional alternative biofuels: Quality assessment of biodiesel and its blends from marine *diatom Navicula cincta*. **Algal Research**, v. 39, n. 101438, 2019.

RAJ, Kanak; KRISHNAN, Chandraraj. Improved co-production of ethanol and xylitol from low-temperature aqueous ammonia pretreated sugarcane bagasse using two-stage high solids enzymatic hydrolysis and *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 153, p. 392–403, 2020.

REIN, P.W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** V.26, p. 44-60, 2007.

REIS, Cristiano E. Rodrigues. *et al.* Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: Vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. **Fuel**, v. 277, n. April, p. 118064, 2020.

RIVERA-GONZÁLEZ, L. *et al.* Long-term forecast of energy and fuels demand towards a sustainable road transport sector in Ecuador (2016-2035): A LEAP model application. **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 2, 2020.

ROBAK, Katarzyna; BALCEREK, Maria. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174–187, April./June. 2018.

ROBERTS Katrina M *et al.* The effects of water interactions in cellulose suspensions on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings. **Cellulose**, v. 18, n. 3, p. 759–773, 2011.

ROCKEMBACH, C. T. *et al.* Síntese do Biodiesel Derivado do Óleo da Semente de Uva Promovida por Ultrassom. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, 2014.

RODRIGUES, Ana Cristina *et al.* Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of

enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79–80, p. 70–77, 2015.

SAINI, Jitendra Kumar; SAINI, Reetu; TEWARI, Lakshmi. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337–353, Aug. 2015.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, Sara *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099-116, June. 2020.

SAMIOS, D. *et al.* A Transesterification Double Step Process — TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 4, p. 599–605, 2009.

SÀNCHEZNOGUÉ, Violeta *et al.* Integrated diesel production from lignocellulosic sugars: Via oleaginous yeast. **Green Chemistry**, v. 20, n. 18, p. 1–36, 2018.

SANTOS, Fernando A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, Fernando A *et al.* Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014

SARKAR, Nibedita *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SHARMA, Bhawna; LARROCHE, Christian; DUSSAP, Claude-Gilles. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123630, 2020.

SILVA, Mariane Daniella da. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zeamays L.*)**. 2018. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2018.

SILVEIRA, Marcos Henrique Luciano *et al.* Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: Pilot scale study. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 138-146, Aug. 2018

SINGH, Gunjan *et al.* High density cultivation of oleaginous yeast isolates in 'mandi' waste for enhanced lipid production using sugarcane molasses as feed. **Fuel**, v. 276, n. 118073, May. 2020.

SOCCOL, Carlos Ricardo *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, Nov. 2010.

SORRELL, S. Reducing energy demand: A review of issues, challenges and approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 74–82, 2015.

SREEHARSHA, Rachapudi Venkata; MOHAN, S. Venkata. Obscure yet Promising Oleaginous Yeasts for Fuel and Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 873–887, Aug. 2020.

STAMENKOVIĆ, Olivera S. *et al.* Production of biofuels from sorghum. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 124, n. Feb. 2020.

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

TABATABAEI, Meisam. *et al.* Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 74, p. 239–303, 2019.

THAI, Quoc Ba *et al.* Cellulose-based aerogels from sugarcane bagasse for oil spill-cleaning and heat insulation applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, n. 115365, 2020.

THLIVEROS, Panagiotis; KIRAN, Esra UÇKUN; E.; WEBB, Colin. Bioresource Technology Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 181–187, 2014.

TOZZI, P.; JO, J. H. A comparative analysis of renewable energy simulation tools: Performance simulation model vs. system optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. February, p. 390–398, 2017.

U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Dielh, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, **2008**, Elsevier B. V., Chapter 1 (Quantitative NMR in the solution state NMR – F. Malz), <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53173-5.X0001-7>.

VIEIRA, Bruno; NADALETI, Willian César.; SARTO, Ewerson. The effect of the addition of castor oil to residual soybean oil to obtain biodiesel in Brazil: Energy matrix diversification. **Renewable Energy**, v. 165, p. 657–667, 2021

WANG, Hongling; HART, Darren J; AN, Yingfeng. Functional Metagenomic Technologies for the Discovery of Novel Enzymes for Biomass Degradation and Biofuel Production. **Bioenergy Research**, v.12, p. 457–470, July. 2019.

WANG, Meixia *et al.* Bioethanol production from cotton stalk : A comparative study of various pretreatments. **Fuel**, v. 184, p. 527–532, 2016.

WU, Yaxiang *et al.* Novel crude glycerol pretreatment for selective saccharification of sugarcane bagasse via fast pyrolysis. **Bioresource Technology**, v. 294, n. 122094, p.1-8, Aug. 2019.

XAVIER, M. C. A *et al.* Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 11–19, 2017.

XUE, Aijuan *et al.* Identification and Characterization of microRNAs from *Saccharum officinarum L* by Deep Sequencing. **Tropical Plant Biology**, v. 10, p. 134–150, July. 2017.

XUE, Ying; JAMEEL, Hasan; PARK, Sunkyu. Strategies to recycle enzymes and their impact on enzymatic hydrolysis for bioethanol production. **BioResources**, v. 7, n. 1, p. 602–615, 2012.

YANG, Jing *et al.* Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4930–4935, 2010.

YOUSUF, Abu. Biodiesel from lignocellulosic biomass - Prospects and challenges. **Waste Management**, v. 32, p. 2061–2067, Apr. 2012.

Yu, Xiaochen *et al.* Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: Hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.116, n. 5, p. 730-737, 2014.

ZHANG, Hongdan *et al.* Biotechnology for Biofuels Enhancing enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by combinatorial pretreatment and Tween 80. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 309, p. 1–12, 2018.

ZHANG, Le. *et al.* Microbial biodiesel production from industrial organic wastes by oleaginous microorganisms: Current status and prospects. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, n. 123543. 2021.

ZHAO, Chen *et al.* A novel and efficient bioprocess from steam exploded corn stover to ethanol in the context of on-site cellulase production. **Energy**, v. 123, p. 499-510, Feb. 2017.

ZHAO, Lei *et al.* Enzymatic saccharification of corn stalk by onsite cellulases produced by *Trichoderma viride* for enhanced biohydrogen production. **GCB Bioenergy**, v. 5, p. 591–598, Oct. 2013.

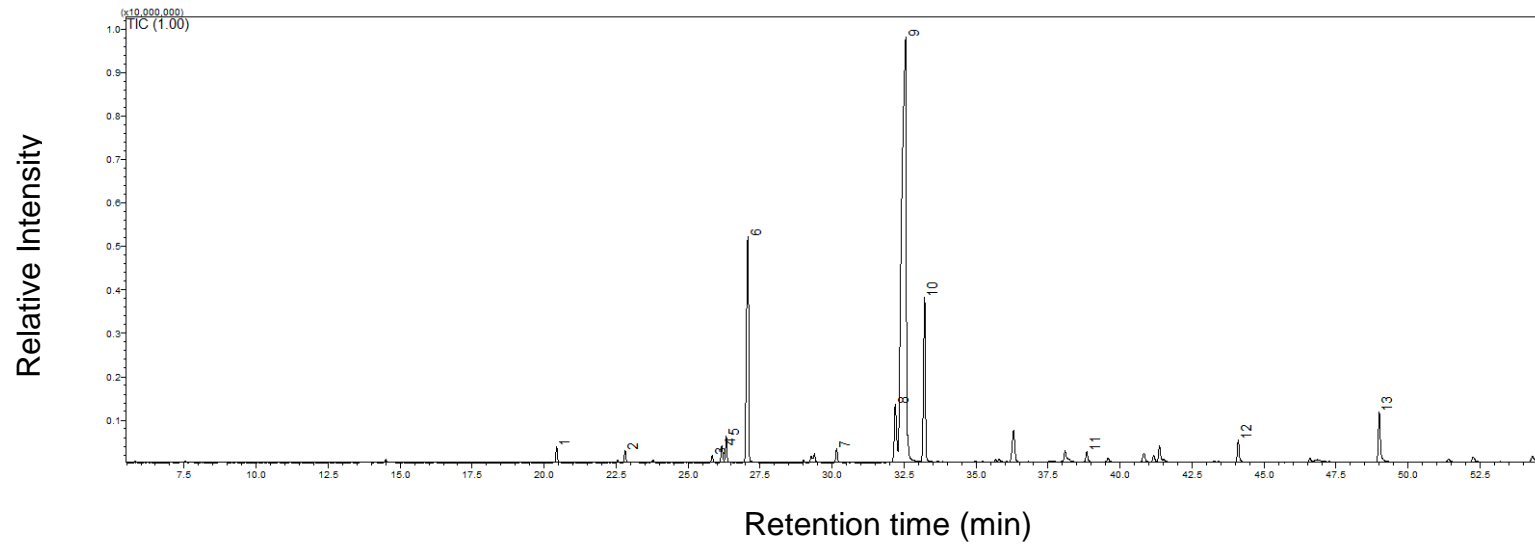
ZHENG, Tianran; JIANG, Jianxin ; YAO, Jianfeng. Surfactant-promoted hydrolysis of lignocellulose for ethanol production. **Fuel Processing Technology**, v. 213, p. 106660, 2021.

ZHOU, Ziyuan *et al.* Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 2683–2702, 2018.

ZHU, Jia-Qing *et al.* Stepwise pretreatment of aqueous ammonia and ethylenediamine improve enzymatic hydrolysis of corn stover. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 201–208, July. 2018.

ZHU, Li *et al.* Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3817–3828, 2008.

### Anexo A- cromatograma CG da amostra de biodiesel



Peak#	R.Time	Area%	Mark	Name
1	20.435	0.77	MI	Methyl tetradecanoate
2	22.813	0.56	MI	Methyl 9-methyltetradecanoate
3	25.836	0.35	MI	Palmitic acid, methyl ester
4	26.171	0.81	MI	Methyl hexadec-9-enoate
5	26.324	1.25	MI	Methyl hexadec-9-enoate
6	27.075	15.31	MI	Palmitic acid, methyl ester
7	30.160	0.65	MI	Heptadecanoic acid, methyl ester
8	32.197	3.75	MI	Linoleic acid, methyl ester
9	32.557	61.99	MI	Elaidic acid, methyl ester
10	33.214	10.22	MI	Stearic acid, methyl ester
11	38.844	0.54	MI	Eicosanoic acid, methyl ester
12	44.102	1.16	MI	Docosanoic acid, methyl ester
13	48.999	2.65	MI	Tetracosanoic acid, methyl ester
				100.00