

ELISA DA SILVA BARRETO

**OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM 2-HIDRÓXI-1,4-NAFTOQUINONA E
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Orientadora: Valéria Monteze Guimarães

Coorientador: Leandro Vinícius Alves Gurgel

VIÇOSA- MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Barreto, Elisa da Silva, 1988-

B273o
2020

Otimização das etapas de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com 2-hidróxi-1,4-naftoquinona e hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração / Elisa da Silva Barreto. – Viçosa, MG, 2020.

132 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. 2-hidróxi-1,4-naftoquinona. 2. Etanol. 3. Reação de oxidação-redução. 4. Hidrólise. 5. Bagaço de cana - Processamento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 541.393

ELISA DA SILVA BARRETO

**OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM 2-HIDRÓXI-1,4-NAFTOQUINONA E
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

Elisa da Silva Barreto
Autora

Valéria Monteze Guimarães
Orientadora

Dedico este trabalho
Aos meus pais, João e Roseli
Ao meu amado noivo, Éder
Minha querida avó Zinha

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me manteve firme, com saúde e força nessa difícil trajetória.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A minha orientadora Prof^a Dra. Valéria Monteze Guimarães pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Por me acolher nesses 6 anos de convivência e por fazer do nosso ambiente de trabalho, um ambiente familiar, de grande amizade e companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel pelos grandes ensinamentos, por me apresentar o maravilhoso mundo da Química, me incentivando a buscar novos conhecimentos. Por ser um grande exemplo para mim.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelas excelentes instalações.

A Universidade Federal de Ouro Preto, ao Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, Grupo de Físico-Química Orgânica e ao Departamento de Química, pela acolhida em suas instalações durante grande parte do doutorado.

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia e aos Professores Dra. Gabriela Maitan-Alfenas e Dr. Sebastião Tavares pelas discussões enriquecedoras e pela companhia amistosa e agradável.

Ao Eduardo Pereira Monteiro (secretário da BQA), pelos serviços prestados e pela paciência ao lidar com tudo.

Aos amigos e amigas do LABQ (Laboratório de Análises Bioquímicas) que foram grandes parceiros nessa jornada. Obrigada por me mostrar como é trabalhar em um ambiente de companheirismo e amizade. Vocês foram a parte mais feliz desse doutorado, minha alegria diária. Lembrarei sempre daqueles cafés maravilhosos, dos planos de fazer dieta, festinhas de aniversário, encontros na casa da Valéria. Jamais me esquecerei do quanto se preocupavam comigo quando precisava trabalhar até tarde, sempre me esperando para não ir embora sozinha. Aos presentes e aos que já foram: Camila Loureiro,

Roberta Corsino, Yan Clevelares, Riziane Gomes, Marciana Morales, Kimberly Beirar, Lucas Filipe, Murillo Peterlini, Rafaela Breder, Rafaela Ladeira, Rafaela Ventorim, Lílian Fialho, Mariana Furtado, Jean Pierre, Luiz Vinícius, Amanda Passarinho, Maria Isabella Petra, Pollyana Cantarutti, Túlio Morgan, Marcele Martins, Ednilson Mascarenhas, Thiago Dutra e Thiago Leal... Obrigada pela amizade e convivência tão agradável nesses 6 anos, vou sentir muita falta de vocês.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental e do Grupo de Físico-Química Orgânica pela acolhida e amizade. Ao Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta pela grande colaboração nos pré-tratamentos. Ao Gustavo Bittencourt, Oscar Herrera, Adonai Bruneli, Yasmin Arantes, Aline Paranhos, Marina Tonucci, André Rossoni, Andressa Rezense e Luísa Maia pelo apoio técnico e amizade. A Natália Tanure, que foi o maior presente que a UFOP me deu, pela amizade, pelos papos agradáveis e pela companhia amistosa.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (UFOP) e ao Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas (UFOP) e as técnicas Msc. Maria José Tropic, Dra. Débora Faria e Dra. Ananda Sanson pelo grande suporte para realizar os ensaios de fermentação e análises de cromatografia. Sempre tão solícitas e simpáticas.

Ao laboratório de Celulose e Papel (UFV) e ao técnico Cássio pela acolhida, ensinamentos e suporte durante os pré-tratamentos em maior escala.

Aos Professores Dr. Márcio César Pereira e Dr. Daniel Pasquini pelas colaborações nas análises de voltametria cíclica e grau de polimerização viscosimétrico das polpas de celulose.

Aos meus pais, João e Roseli, pelo carinho e amor. Por terem sido meu grande incentivo para continuar essa caminhada.

Ao Éder, pelo amor, apoio, paciência, ensinamentos e sábios conselhos. Por fazer os meus dias mais felizes e ser meu porto seguro nos momentos mais difíceis. Por ser uma grande inspiração para mim e um grande exemplo de pessoa.

A minha segunda mãe, avó Zinha pelo carinho. Não teria chegado tão longe sem ela.

A minha querida Tiamar (Rosemar), pelas conversas animadas e pela amizade.

Aos meus familiares (Silva e Barreto) pela acolhida com amor e carinho sempre.

RESUMO

BARRETO, Elisa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Otimização das etapas de pré tratamento alcalino com 2-hidróxi-1,4-naftoquinona e hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientador: Leandro Vinícius Alves Gurgel.

O presente trabalho propõe a utilização de um novo mediador redox (2-hidróxi-1,4-naftoquinona (HNQ)) para promover ciclos de oxidação e redução, visando preservar as frações de carboidratos e aumentar a deslignificação, durante o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando hidróxido de sódio. Para avaliar as condições operacionais do pré-tratamento soda-HNQ, foram gerados dois planejamentos experimentais: fatorial fracionado (2^{5-1} , resolução V) e composto central (2^2). Os resultados mostraram que a carga de HNQ usada no pré-tratamento foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a preservação dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) e deslignificação da biomassa. A condição experimental gerada pela ferramenta de desejabilidade ($9,57 \text{ mL g}^{-1}$, 150°C , 60 min), utilizada para avaliar o desempenho dos mediadores redox HNQ [$0,4\%$ (m m^{-1})] e AQ (antraquinona) [$0,493\%$ (m m^{-1})], permitiu obter polpas com grau de polimerização da celulose de 2033 e 1701, respectivamente. O pré-tratamento soda-HNQ do bagaço de cana resultou em uma solubilização de 22,2% e 34,7% menor das frações de celulose e hemiceluloses, respectivamente, comparado ao pré-tratamento soda-AQ. Os modelos de regressão, para os teores de celulose e hemiceluloses, apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 93,5 e 70,4%, respectivamente, indicando que apenas 6,5% e 29,6% da variabilidade não pôde ser explicada pelo modelo. O processo de otimização da etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado soda-HNQ, utilizando batelada alimentada e adição de surfactante Tween 80 aos ensaios, permitiu atingir o máximo da produção de açúcares redutores totais ($142,0 \text{ g L}^{-1}$), com baixa carga de enzimas (3 FPU g^{-1}) e alto teor de sólidos (15%). A fermentação do hidrolisado enzimático pelo consórcio CERLEV 47 + CERLEV 1015, resultou em uma produção máxima de etanol de $61,3 \text{ g L}^{-1}$. A estimativa de produção de etanol de segunda geração, a partir do processo desenvolvido, é de 244 kg etanol por tonelada de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: 2-hidróxi-1,4-naftoquinona. Mediador redox. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática. Fermentação. Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

BARRETO, Elisa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Optimization of alkaline pretreatment with 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone and enzymatic hydrolysis for second-generation ethanol production.** Advisor: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisor: Leandro Vinícius Alves Gurgel.

The present study proposes the use of a new redox mediator (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ)) to promote oxidation and reduction cycles in order to preserve carbohydrate fractions and increase delignification, during the alkaline delignification process by sodium hydroxide. To evaluate the operational conditions of the Soda-HNQ pretreatment, two experimental designs were generated: fractional factorial (2^{5-1} , resolution V) and central composite (2^2). The results showed that the load of redox mediator HNQ was statistically significant ($p < 0.05$) for the preservation of carbohydrates (cellulose and hemicelluloses) and delignification of the biomass. The experimental condition generated by the desirability tool (9.57 mL g^{-1} , 150°C , 60 min), evaluated for evaluation of the performance of redox catalysts HNQ [0.4% (m m^{-1})] and anthraquinone [0.493% (m m^{-1})], allowed to obtain a pulp with degree of polymerization of cellulose of 2033 and 1701, respectively. The comparison with anthraquinone revealed that the redox catalyst HNQ led to a lower solubilization of cellulose (22.2%) and hemicelluloses (34.7%), respectively. The regression models for the contents of cellulose and hemicelluloses showed coefficient of determination (R^2) of 93.5 and 70.4%, respectively, which indicate that only 6.5% and 29.6% of the variability could not be explained by the model. The optimization of the enzymatic hydrolysis process led to a maximum production of total reducing sugars of 142.0 g L^{-1} , with low enzyme load (3 FPU g^{-1}) and high content of solids (15%), through the use of the fed batch strategy and addition of surfactant Tween 80 to the tests. The fermentation of enzymatic hydrolysate resulted in the maximum ethanol production of 61.3 g L^{-1} by the CERLEV 47 + CERLEV 1015 consortium. The estimated production of 2G ethanol from the proposed technology is 244 kg of ethanol per ton of sugarcane bagasse.

Keywords: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone. Second-generation ethanol. Enzymatic hydrolysis. Redox catalyst. Anthraquinone. Lawsone.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas

Figura 1: Estruturas da antraquinona e seus derivados e da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona

Figura 2: Etapas para a produção de E2G

Figura 3: Biorrefinaria lignocelulósica. Após o fracionamento, os polímeros são convertidos em diversos produtos de valor agregado

Figura 4: Representação esquemática da estrutura química e ligações intra- e intermoleculares de hidrogênio na celulose cristalina

Figura 5: Transformação da celulose em vários polimorfos.

Figura 6: Modelo esquemático da hidrólise enzimática da celulose

Figura 7: Exemplos de estruturas de hemiceluloses presentes nas paredes celulares, incluindo monossacarídeos, e seus constituintes de ligação éster

Figura 8: Modelo esquemático da hidrólise enzimática das hemiceluloses

Figura 9: Blocos monoméricos constituintes da lignina. A presença e localização desses depende da fonte vegetal

Figura 10: Representação esquemática da estrutura da lignina

Figura 11: Inibição enzimática causada pela lignina

Figura 12: Exemplo de mecanismo de clivagem das ligações β -O-4 da molécula de lignina durante o processo (polpação) soda

Figura 13: Ciclo redox proposto para explicar a ação catalítica da antraquinona durante a polpação

Figura 14: Exemplo de mecanismo da deslignificação na polpação kraft envolvendo a ligação do SH⁻ aos fragmentos de lignina e conseqüentemente a fragmentação

Figura 15: Estrutura da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), corante natural da Henna, encontrado nas folhas da planta *Lawsonia inermis*

CAPÍTULO II - 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) as a redox catalyst for the alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

Figure 1. (a) Chemical structures of anthraquinone (AQ) and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) and (b) redox reaction of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Bailey & Ritchie, 1985).

Figure 2. Response surfaces generated from the quadratic model for (a) lignin content (*LC*), (b) cellulose content (*CC*), (c) hemicelluloses content (*HC*) and (d) lignin removal (*LR*) as function of HNQ load ($w w^{-1}$) and *LSR* ($mL g^{-1}$).

Figure 3. Cyclic voltammograms for 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) and anthraquinone (AQ) at different pH values. Electrolyte: 0.5 mol L^{-1} NaOH; scan rate: 5 mV s^{-1} .

Figure S1: Pareto Chart with first and second order interactions for the chemical composition of pretreated bagasse. Temperature ($^{\circ} \text{C}$); time (min); HNQ ($\%, w w^{-1}$); RLS ($mL g^{-1}$); NaOH ($\%, w w^{-1}$).

Figure S2: Pareto Chart with first and second order interactions for the chemical composition solubilization of pretreated bagasse. Temperature ($^{\circ} \text{C}$); time (min); HNQ ($\%, w w^{-1}$); *LSR* ($mL g^{-1}$); NaOH ($\%, w w^{-1}$).

Figure S3: Pareto Chart of central composite with linear and quadratic effects.

CAPÍTULO III - Otimização da eficiência da hidrólise enzimática em bagaço de cana pré tratado soda-HNQ com alto teor de sólidos e baixa carga de enzimas por estratégia de bateada alimentada com adição de *Tween 80*

Figura 1: Sistema utilizado na fermentação a etanol com agitação de 350 rpm

Figura 2: Diagrama de Pareto do planejamento experimental Composto Central

Figura 3: Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de hidrólise e carga de enzimas na produção de açúcares redutores totais (ART)

Figura 4: Efeito da concentração do substrato na concentração de açúcares redutores totais produzidos durante a sacarificação

Figura 5: Efeito do teor de sólidos na concentração de açúcares redutores totais produzidos durante a sacarificação

Figura 6: Conversão da biomassa em açúcares redutores ($g g^{-1}$)

Figura 7: Hidrólise enzimática em modo batelada e batelada alimentada

Figura 8: Produção estimada de etanol utilizando duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e duas espécies fermentadoras de xilose, *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia guilliermondii*

Figura 9: Rendimento do processo global da produção de etanol de segunda geração a partir do processamento de 1 tonelada de cana de açúcar durante a produção de etanol de primeira geração, estabelecido no presente trabalho. BC: Bagaço de cana

CAPÍTULO IV - Utilização de aditivos no extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e o efeito na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ

Figura 1: Efeito dos coquetéis na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ

Figura 2: Mecanismo do duplo efeito dos *Tween* durante a hidrólise enzimática, proposto por *Wang* et al.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Revisão de literatura

Tabela 1: Visão geral dos produtos que podem ser gerados em biorrefinaria lignocelulósica

Tabela 2: Conteúdo de lignina em espécies selecionadas e tecidos de planta

Tabela 3: Vários reagentes de pré-tratamentos alcalinos, suas condições e efeitos.

CAPÍTULO II - 2-hydroxy-1,4-napthoquinone (lawsone) as a redox catalyst for the alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

Table 1. Matrix of experiments for 2^{5-1} experimental screening design in terms of uncoded levels and the results obtained for the responses evaluated

Table 2. Matrix of experiments for 2^2 central composite design in terms of uncoded levels and the results obtained for the responses evaluated

Table 3. Validation of pretreatment conditions predicted by desirability tool and comparison of the performance of the redox catalysts HNQ and AQ for soda pretreatment of raw SB.

Table S1: Regression coefficients for dependents variable considered in Central Composite design

CAPÍTULO III - Otimização da eficiência da hidrólise enzimática em bagaço de cana pré tratado soda-HNQ com alto teor de sólidos e baixa carga de enzimas por estratégia de bateada alimentada com adição de *Tween 80*

Tabela 1: Condições experimentais geradas pelo delineamento experimental Composto Central para seleção das condições de carga de enzimas e tempo de hidrólise, açúcar redutor total (ART) produzido e conversão da biomassa em açúcares redutores

Tabela 2: Modo de alimentação nos ensaios de hidrólise enzimática em batelada alimentada

Tabela 3: Composição bioquímica e solubilização dos componentes estruturais do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ em maior e menor escala

Tabela 4: Análise de variância para o modelo polinomial quadrático ajustado

Tabela 5: Avaliação da proporção ideal dos coquetéis enzimáticos de celulases (Cellic Ctec 2) e hemicelulases (Cellic Htec 2).

Tabela 6: Estratégias adotadas para hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

Tabela 7: Produção de etanol de segunda geração a partir do hidrolisado enzimático

CAPÍTULO IV - Utilização de aditivos no extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e o efeito na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ

Tabela 1: Avaliação da utilização de diferentes aditivos no coquetel do *Chrysosporthe cubensis* durante a sacarificação do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ, utilizando 3 FPU g⁻¹, durante 72h

LISTA DE SIGLAS

- AHQ:** Anthrahydroquinone
- AQ:** Antraquinona ou anthraquinone
- ART:** Açúcar redutor total
- BCPT:** Bagaço de cana pré tratado
- BC:** Bagaço de cana
- CBH:** Celobiohidrolases (EC 3.2.1.9.1)
- CC:** conteúdo de celulose (content of cellulose)
- CE_G:** Conversão enzimática a glicose
- CE_X:** Conversão enzimática a xilose
- C_{enzimas} :** Carga de enzimas
- CERLEV 1105:** *Wickerhamomyces anomalus*
- CERLEV 1015:** *Pichia guilliermondii*
- CH:** conteúdo de hemiceluloses (content of hemicelluloses)
- CL:** conteúdo de lignina (content of lignin)
- CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLC:** Complexo lignina- carboidrato
- CP:** Central point
- CR:** Cellulose removal
- C_{sólidos} :** Carga de sólidos
- Ctec 2:** Coquetel enzimático CellicCtec 2 da Novozymes
- C5:** Pentoses
- C6:** Hexoses
- DC:** desirable conditions
- DO:** Densidade óptica
- DP:** Degree of polymerization
- DVs:** Dependente variables
- EC:** Enzymatic conversion
- EC_G:** Enzymatic conversion to glucose
- EC_X:** Enzymatic conversion to xylose
- EG:** Endo-1,4- β-D- glicanase (EC 3.2.1.4)
- E1G:** Etanol de primeira geração
- E2G:** Etanol de segunda geração
- FF:** 2-furfuraldehyde

FPU: Unidade de papel filtro (Filter Paper Unit)

GP: Grau de polimerização

GL: Graus de liberdade

HMF: 5- hydroxymethyl-2-furfualdehyde

HNQ: 2-hidróxi- 1,4- naftoquinona (lausona) ou 2-hidroxy- 1,4- naphtoquinone (Lawsone)

HPLC: High performance liquid chromatography

HR: Hemicellulose removal

Htec 2: Coquetel enzimático CellicHtec 2 da Novozymes

IU: Unidade internacional

IVs: Independente variables

L: Efeito linear

LAP: Laboratory Analytical Procedures

LB: Lignocellulose biomass

LCC: Lignin-carbohydrate complexes

LR: lignin removal

LSR: Liquid- solid ratio

MLC: módulo de ligação a carboidratos

NaOH: Hidróxido de sódio

MSR: Metodologia de superfície de resposta

NREL: National Renewable Energy Laboratory

OGY: Overall yield of glucose

OXY: Overall yield of xylose

PC: Ponto central

Pe-2: Pedra-2 (cepa de *Saccharomyces cerevisiae*)

PT: Pré tratamento

Q: Efeito quadrático

RC: remoção da celulose

R_{Cat}: Redox catalyst

RHC: Reversible hydrogen eletrode

RSM: Response surface methodology

RH: Remoção das hemiceluloses

RL: Remoção da lignina

SB: Sugarcane bagasse

SB-AQ: Sugarcane bagasse soda-AQ pretreated

SB-HNQ: Sugarcane bagasse soda-HNQ pretreated

SQ: Soma dos quadrados

SSF: Fermentação em estado sólido (Solid State Fermentation)

t: Tempo

T: Temperatura

TAPPI: Technical Association of the Pulp and Paper Industry

TH: Tempo de hidrólise

Y: Yield

YPD: Yeast Extract Peptona Dextrose

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS	14
Introdução e justificativa.....	18
Hipóteses do trabalho.....	22
Objetivos	23
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO I	24
A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas	25
1- A produção de etanol de segunda geração.....	25
1.2- Biorrefinaria lignocelulósica	27
2- Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	31
2.1- Celulose	31
2.2- Hemiceluloses.....	34
2.3- Lignina.....	37
3- Deslignificação alcalina.....	41
4- Pré-tratamento soda-AQ	44
5- Mediador redox 2-hidróxi-1,4-naftoquinona.....	46
6- Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO II.....	55
2-hydroxy-1,4-napthoquinone (lawsone) as a redox catalyst for the alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse.....	56
Graphical abstract	57
Highlights.....	57
Abstract.....	58
1- Introduction.....	59
2- Material and methods.....	60
2.1- Feedstock.....	60
2.2- Sugarcane bagasse pretreatment, experimental design, and statistical analyses	61
2.3-Analytical methods for characterization of solid and liquid fractions.....	62
2.4- Degree of polymerization	63
2.5- Cyclic voltammetry	63
2.6- Enzymatic hydrolysis	64
3- Results and discussion	65
3.1- Characterization of the raw sugarcane bagasse	65
3.2- Experimental screening design for evaluation of soda-HNQ pretreatment of raw sugarcane bagasse	65
3.3- Optimization of soda-HNQ pretreatment of raw sugarcane bagasse by surface response methodology	69
3.4- Desirability tool and validation of the statistical model.....	73
3.5- Cyclic voltammetry of the redox catalysts	73
3.6- Effect of redox catalysts HNQ and AQ on chemical composition, enzymatic hydrolysis and degree of polymerization of pretreated SB.....	75
4- Conclusions.....	77
5- Acknowledgments.....	77
6- Electronic Supplementary Material	78

7- References.....	82
CAPÍTULO III.....	85
Otimização da eficiência da hidrólise enzimática em bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ com elevado teor de sólidos e baixa carga de enzimas por estratégia de bateada alimentada com adição do surfactante <i>Tween 80</i>	86
1- Introdução	86
2- Metodologia	88
2.1- Pré tratamento do bagaço de cana.....	88
2.2- Otimização das condições de hidrólise enzimática.....	89
3- Resultados e discussão	95
3.1- Composição química do material pré-tratado com soda/HNQ.....	95
3.2- Seleção das variáveis-chave e coquetel enzimático para hidrólise enzimática com elevado teor de sólidos	96
3.3- Exploração da hidrólise enzimática com elevado teor de sólidos pela estratégia de batelada alimentada e uso de <i>Tween 80</i>	104
3.4- Fermentação do hidrolisado enzimático por diferentes espécies de leveduras	107
3.5- Processo global da produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana pré tratado soda/HNQ no cenário brasileiro	110
4- Conclusões	112
5- Referências bibliográficas.....	114
CAPÍTULO IV.....	119
Utilização de aditivos no extrato enzimático do fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> e o efeito na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ	119
1- Introdução	120
2- Materiais e métodos	121
2.1- Materiais	121
2.2- Metodologia	122
3- Resultados e discussão	126
4- Conclusões do capítulo	129
5- Referências bibliográficas.....	130
Conclusões gerais do trabalho	132

Introdução e justificativa

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, estima-se que na safra 2019/2020 o cultivo de cana-de-açúcar seja de, aproximadamente, 647 milhões de toneladas (CONAB, 2017). No Brasil, as principais aplicações desta cultura são na produção de açúcar e de etanol de primeira geração (E1G), e de fato, esses mercados competem pela matéria prima. Vale ressaltar que desde a safra 2013/2014, as usinas brasileiras têm destinado mais açúcar total recuperável (ATR) para a produção etanol.

O crescente aumento na demanda por combustíveis líquidos está relacionado principalmente à ampliação da frota de veículos leves, cujo atendimento, até 2009, foi feito majoritariamente por meio do aumento da produção interna de etanol. A produção, entretanto, não é capaz de atender à demanda atual. Por isso, o crescente número de veículos passou a consumir mais gasolina, aumentando o volume de importações, haja vista a capacidade limitada de refino no Brasil (BNDES, 2015).

No entanto, sabe-se que a queima da gasolina em motores de combustão interna do ciclo Otto contribui significativamente para a liberação de gases poluentes no ambiente, principalmente CO, CO₂, NO_x e SO_x. Em 2015, segundo a Agência Internacional de Energia (IEA), os combustíveis fósseis foram responsáveis pela liberação de mais 32,294 bilhões de toneladas de CO₂ (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2017). Nesse cenário, vários países apresentaram propostas para conter o avanço catastrófico da poluição ambiental. Na ocasião, o Brasil se comprometeu a incentivar e aumentar o consumo dos biocombustíveis de primeira e segunda geração (21^a Conferência das Partes-COP-21).

Desse modo, é indispensável buscar formas de aumentar a produtividade e atratividade econômica do etanol. Dentre as opções tecnológicas que vêm sendo desenvolvidas no Brasil, destacam-se as iniciativas dedicadas ao avanço tecnológico para a produção de etanol de segunda geração (E2G), cuja produtividade implicará em um aumento de até 50 % na quantidade produzida, sem interferir no setor de alimentos e/ou aumentar áreas de plantio.

O E2G, também chamado de etanol celulósico, é produzido a partir de biomassas lignocelulósicas. No Brasil, esta tecnologia poderá permitir a utilização de todo o excedente de bagaço e palha de cana-de-açúcar, acumulados pelas usinas sucroalcooleiras durante a safra. Esta tecnologia de produção permite também a utilização de vários materiais lignocelulósicos, ou resíduos agrícolas, como palha de trigo, feno de

milho, resíduos florestais e culturas dedicadas (salgueiro, sorgo doce, dentre outras) (GALBE & ZACCHI, 2007).

A biomassa lignocelulósica é composta, principalmente, de celulose (40-50%), hemiceluloses (25-35%) e lignina (10-25%) (KUMAR *et al.*, 2016). Para produção de E2G, o material precisa ser submetido às etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação. O pré-tratamento visa à desestruturação da parede celular vegetal, devido à sua elevada resistência química à degradação, facilitando o acesso das enzimas, na etapa seguinte. Na etapa de hidrólise enzimática ou sacarificação, os polissacarídeos são hidrolisados, liberando açúcares fermentescíveis (hexoses a partir de celulose e pentoses a partir de hemiceluloses, respectivamente). Uma vez gerados, os açúcares podem ser fermentados a etanol, de forma semelhante ao que é feito no processo de produção de E1G.

Deve-se se ressaltar, no entanto, que o baixo custo benefício dos processos tecnológicos empregados no pré-tratamento e hidrólise enzimática, e o rendimento de açúcares fermentescíveis torna a produção economicamente inviável no presente momento. A eficácia do pré-tratamento está acoplada à necessidade de diminuição da cristalinidade da celulose, manutenção da fração de polissacarídeos, deslignificação do material e na não geração de inibidores das etapas de hidrólise e fermentação. Dentre os principais compostos inibitórios, destaca-se o ácido acético, produzido a partir da hidrólise ácida das hemiceluloses, que interfere no metabolismo das leveduras fermentadoras, além de 2-furfuraldeído, 2-hidróximetil-2-furfuraldeído e compostos fenólicos derivados da lignina que inibem a atividade enzimática durante a etapa de sacarificação. Também a presença da lignina afeta negativamente o processo, uma vez que pode provocar impedimento estérico, ou seja, impedir o acesso das enzimas ao substrato (celulose) e também promove a adsorção improdutiva das enzimas lignocelulolíticas.

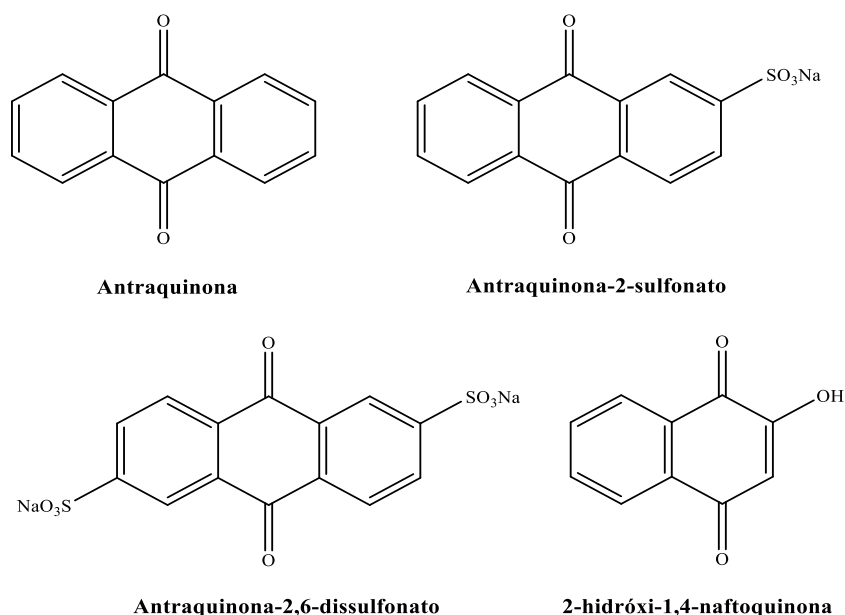
Dessa forma, trabalhos anteriores mostraram que a técnica de deslignificação alcalina é adequada para atender às exigências mencionadas anteriormente, sendo o hidróxido de sódio (NaOH) um dos catalisadores mais eficientes (AGBOR *et al.*, 2011). Nesse processo, o NaOH promove reações que favorecem a degradação da lignina e a dissolução de seus fragmentos por meio da hidrólise das ligações α - e β -aril-alquil-éter (C-O-C)(CHEN, H. Z. *et al.*, 2015).

Embora o NaOH seja essencial para uma rápida polpação (deslignificação), sua presença pode dissolver mais de 50% das hemiceluloses e 5-10% da celulose (DIMMEL *et al.*, 2010), o que não é desejável, visto que os açúcares liberados não são recuperados.

Existe, portanto, a necessidade de contornar essa situação, visando melhorar a eficiência e o rendimento do processo. Uma das soluções tecnológicas seria a utilização de catalisadores que possibilitassem uma maior deslignificação combinada com a manutenção da fração de polissacarídeos, durante o pré-tratamento. Nesse sentido, a exemplo da indústria de papel e celulose que utiliza baixas cargas de antraquinona (0,1 a 0,5%, m/m), um mediador redox que promove ciclos de oxidação e redução (oxidação da extremidade aldeído a ácido aldônico nos carboidratos e redução da lignina fragmentada), é importante a busca por catalisadores redox que possam favorecer o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar. Estudos mostraram que a extremidade ácido aldônico deixa os carboidratos mais estáveis e isso previne a perda por despolimerização alcalina terminal, enquanto a redução da lignina é acelerada aumentando a seletividade do processo de deslignificação (CHAI *et al.*, 2007).

Atualmente, a antraquinona e seus derivados (ex.: anthraquinona-2-sulfonato (AQS), anthraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS)) (**Figura 1**) são os mediadores redox descritos. Entretanto, como mostrado por Nascimento *et al.* (2016), a utilização de AQS e AQDS, em um contexto de biorrefinaria lignocelulósica, torna-se inviável, devido à inibição que estes compostos causam na hidrólise enzimática. Assim, o presente trabalho propõe avaliar uma nova molécula: 2-hidróxi-1,4-naftoquinona (HNQ) (**Figura 1**), que também pertence à família das quinonas, que são moléculas de elevada resistência à alcalinidade e temperatura. Espera-se-se que o HNQ possa exibir a eficiência comparável à antraquinona, mas sem exercer o efeito inibitório na etapa de sacarificação da biomassa.

Figura 1: Estruturas da antraquinona e seus derivados e da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona.



No presente estudo, os processos de otimização do pré-tratamento alcalino foram realizados, mediante avaliação da influência das variáveis do processo (quantidade de NaOH, razão líquido-sólido, temperatura, tempo e quantidade de HNQ) sobre as variáveis resposta do processo (deslignificação, preservação das frações de celulose e hemiceluloses, conversão enzimática dos polissacarídeos a glicose e xilose). Para o aprimoramento do pré-tratamento, foram realizados um planejamento experimental fracionado (resolução V) exploratório do tipo 2^{5-1} e um de otimização composto central do tipo 2^2 , para a avaliar o comportamento das variáveis e otimizar o processo, respectivamente, tendo sido selecionada a condição que permitiu maximizar a deslignificação e a preservação dos carboidratos.

A hidrólise enzimática também é alvo de desenvolvimento tecnológico. É uma etapa crucial e atualmente constitui um desafio para a viabilidade do processo, devido ao elevado custo das enzimas, baixa eficiência e o longo tempo de sacarificação. Visando diminuir a carga enzimática, proteínas não catalíticas, surfactantes não iônicos e polímeros estão sendo usados como aditivos para aumentar o rendimento do processo (ZHANG, HONGDAN et al., 2017). Em outra linha, pesquisas mostraram processos de otimização da hidrólise enzimática, avaliando o efeito da agitação do meio reacional (VERARDI et al., 2016), carga enzimática e quantidade de sólidos (MODENBACH et al., 2013). Em trabalhos recentes, a estratégia de batelada alimentada permitiu realizar ensaios de hidrólise enzimática com maior teor de sólidos, sem diminuir o rendimento de açúcares fermentescíveis. Sugiharto *et al.* (2016) utilizaram o sistema de alimentação periódica e obtiveram rendimento de glicose 26% superior comparado ao tratamento em único estágio com carga de sólidos de 25% ($m v^{-1}$).

Dessa forma, o presente trabalho traz novas contribuições para o desenvolvimento dos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração.

Esta tese foi dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo I: apresenta uma revisão de literatura

Capítulo II: apresenta o desenvolvimento e otimização do pré-tratamento soda-HNQ e as implicações nas características bioquímicas e estruturais do material pré-tratado. Além disso, traz informações sobre o comportamento de oxidação e redução da molécula mediadora redox. Está apresentado na forma de artigo em inglês, que foi submetido para Bioresource Technology, como exigência do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.

Capítulo III: otimização dos ensaios enzimáticos, visando diminuir a carga de enzimas e aumentar o teor de sólidos, mantendo alto rendimento de hidrólise, usando ensaios em batelada alimentada na presença/ausência do surfactante Tween 80. Em seguida, foi realizada a fermentação por quatro espécies de leveduras cultivadas isoladas e em consórcio.

Hipóteses do trabalho

Essa tese se fundamenta nas seguintes hipóteses:

- 1) A utilização de um mediador redox natural e resistente a altas temperaturas e alcalinidade, como o 2-hidróxi-1,4-naftoquinona, será uma interessante alternativa aos mediadores derivados de antraquinona (AQ), para atuar na preservação dos carboidratos e na deslignificação de bagaço de cana durante o pré alcalino por hidróxido de sódio (soda). Além disso, por ser uma molécula natural, o 2-hidróxi- 1,4 naftoquinona não inibirá as enzimas durante a sacarificação do bagaço de cana pré tratado soda/HNQ, como ocorre na biomassa pré tratada soda/AQ;
- 2) Após a obtenção do bagaço de cana altamente deslignificado, será possível diminuir os efeitos de adsorção improdutiva que a lignina exerce sobre as enzimas lignocelulolíticas, e isso permitirá realizar eficiente sacarificação da biomassa utilizando baixas cargas de enzimas;
- 3) A utilização de baixas cargas de enzimas durante a sacarificação do bagaço de cana poderá dificultar a realização de ensaios com elevado teor de sólido devido, principalmente, ao aumento da viscosidade do sistema e dificuldades na transferência de massa durante as reações de hidrólise. A adição periódica de biomassa pré tratada ao ensaio de hidrólise enzimática poderá manter a baixa viscosidade do meio reacional, e permitir realizar a reação com elevado teor de sólidos finais .
- 4) A utilização do *Tween* 80 aos ensaios de sacarificação do bagaço de cana poderá melhorar a produção de açúcares redutores totais por atuar na manutenção da atividade das enzimas lignocelulolíticas, quando submetidas a condições de agitação e alta temperatura (50 °C).

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é contribuir para o aumento da viabilidade técnica e econômica da produção de etanol de segunda geração, a partir da otimização das etapas de pré-tratamento alcalino (soda-HNQ) e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, em um contexto de biorrefinaria lignocelulósica.

Objetivos específicos

- 1) Avaliar a utilização do mediador redox HNQ durante o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, otimizando o pré-tratamento soda-HNQ a partir das variáveis independentes razão líquido-sólido, temperatura, tempo de processamento, carga de NaOH (m m^{-1}) e carga de HNQ (m m^{-1});
- 2) Avaliar as variáveis que interferem no desempenho do pré-tratamento soda-HNQ na fração sólida do bagaço de cana com base nos resultados de rendimento (massa seca recuperada após os pré-tratamentos), conteúdos residuais de celulose, hemiceluloses e lignina, remoção de celulose, hemiceluloses e lignina e conversão enzimática dos polissacarídeos a glicose e xilose;
- 3) Comparar o efeito da HNQ à antraquinona no pré tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana;
- 4) Conhecer os parâmetros de hidrólise enzimática como coquetel enzimático, carga de enzimas e carga de sólidos ideais para a biomassa pré-tratada com soda/HNQ;
- 5) Melhorar os rendimentos de açúcares liberados na hidrólise enzimática por estratégia de batelada alimentada na presença e ausência do surfactante *Tween 80* (0,1 % (v v⁻¹)), usando alto teor de sólidos e baixa carga de enzimas;
- 6) Produzir etanol de segunda geração a partir do hidrolisado enzimático e avaliar o potencial de fermentação de quatro espécies de leveduras cultivadas e isoladas e em consórcio;
- 7) Promover ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ, utilizando o *blend* CellicCtec 2 e o extrato enzimático bruto, produzido pelo *Chrysosporthe cubensis*;
- 8) Avaliar a suplementação da sacarificação enzimática com o *blend* Ctec:CC, pelos aditivos soro de queijo, soro albumina bovina, *Tween 80* e HNQ.

CAPÍTULO I

**A produção de etanol de segunda geração a partir de
biomassas lignocelulósicas**

A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas

1- A produção de etanol de segunda geração

Em 2015, o consumo mundial de óleo equivalente foi de 13,6 bilhões de toneladas, incluindo 31,7% de petróleo, 21,8% de carvão e turfa (peat), 21,6% de gás natural, enquanto os biocombustíveis contribuíram com apenas 9,7%. No mesmo ano, foram liberadas mais 32,294 bilhões de toneladas de CO₂, provenientes da queima de combustíveis fósseis (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2017).

Visando diminuir a liberação dos gases de efeito estufa, vários países firmaram um acordo na 21ª Conferência das Partes (COP-21), em Paris no ano de 2016. Na ocasião, o Brasil apresentou um compromisso de fortalecer a utilização de energia sustentável para aproximadamente 18% até 2030. Entre as principais políticas públicas destacam-se o incentivo ao consumo e oferta de etanol (E1G e E2G) e aumento da parcela de biodiesel no diesel (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2017). Sendo o setor de transporte o principal consumidor dos combustíveis líquidos, a utilização dos biocombustíveis é bastante viável, uma vez que os motores de combustão interna movidos a etanol e flex fuel (bicombustível) são conhecidos e difundidos, não havendo, portanto, necessidade de modificação mecânica dos veículos (MANOCHIO *et al.*, 2017).

As usinas de etanol brasileiras, no entanto, competem diretamente com o mercado de alimentos pela matéria prima. Desde a safra 2013/2014 tem sido destinado mais açúcar total recuperável (ATR) para a produção de etanol (CONAB, 2017). Por isso, diante da crescente demanda, estima-se a necessidade de aumento das áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Pesquisas apontam que até 2021 a safra seja de 1038 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, quase o dobro em comparação aos 569 milhões de toneladas da safra 2008/2009.

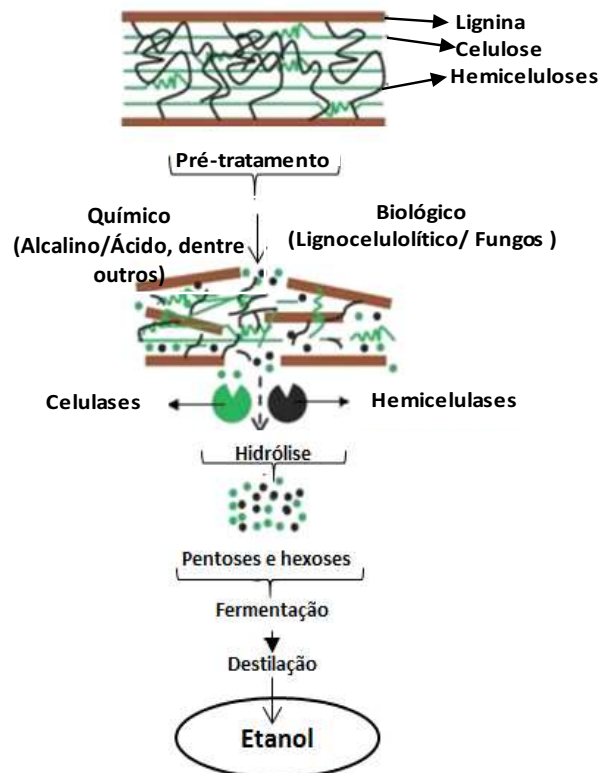
Entretanto, considerando todo potencial energético contido em uma tonelada de cana-de-açúcar, apenas um terço está na forma de sacarose, a qual é utilizada na produção de E1G. Os dois terços restantes, representados pelo material lignocelulósico, contidos no bagaço e palha da cana, são utilizados para a produção de energia elétrica (bioeletricidade), e o excedente do processo é armazenado ou descartado, representando um grave problema ambiental (DANTAS *et al.*, 2013).

Diante disso, visando aumentar a produtividade de etanol, sem aumentar as áreas de cultivo, gasto com insumos agrícolas e competitividade com o mercado de alimentos, pesquisas têm concentrado esforços na produção de E2G (etanol celulósico) (ALONSO *et al.* 2010), cujo processo tecnológico ainda está em fase de consolidação no Brasil e no mundo. No Brasil, os primeiros litros de E2G começaram a ser produzidos no final de

2014 pelas pioneiras Granbio e Raízen que, juntas, possuem capacidade de produzir cerca de, apenas, 120 milhões de litros de E2G por ano (NETO *et al.*, 2018). Atualmente a produção de E1G é próxima de 31 bilhões de litros por ano e estima-se que a demanda atinja 50 bilhões de litros por ano até 2030 (EPE, 2017).

A produção de E2G difere da produção de E1G pela necessidade de pré-tratar a matéria prima, porque as operações de fermentação e destilação podem compartilhar a mesma estrutura, o que aumenta a viabilidade econômica do processo (DIAS *et al.*, 2012). Devido a sua composição, que apresenta celulose (40-50%), hemiceluloses (25-35%) e lignina (10-25%), a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida às etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática que, consistem em fragmentar a biomassa em seus constituintes majoritários e gerar açúcares fermentescíveis (glicose a partir de celulose e xilose a partir de hemiceluloses), respectivamente (Figura 1. Uma vez liberados, os açúcares serão fermentados por leveduras, como acontece na produção de E1G (KUMAR *et al.*, 2016).

Figura 1: Etapas para a produção de E2G. **Fonte:** Anwar *et al.* (2014) (adaptada).



Entretanto, as limitações tecnológicas têm sido a principal barreira para produção em escala comercial de E2G, e apenas seis empresas em todo o mundo alcançaram produção neste nível, o que mostra que nessa área há muito a ser estudado. Além disso,

o desafio de um substrato rico em pentoses contribui para o insucesso do processo devido à barreira física, causada pelo polímero, que dificulta o acesso à celulose (LENNARTSSON *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2018).

Considerando aspectos econômicos para a produção de E2G, o estudo de Milanez *et al.* (2015) indicou que a produção será competitiva com o E1G a médio prazo (depois de 2024). Esses autores apontam que os principais fatores que contribuem para o custo atual da produção são investimento na planta, tipo de biomassa e enzimas lignocelulolíticas. De acordo com as premissas do estudo, o custo do E2G será competitivo com o petróleo, USD \$ 44 por barril, a longo prazo. Enquanto Raele *et al.* (2014) apostam que a saturação da produtividade nas usinas de primeira geração estimulará as usinas e laboratórios a viabilizar o E2G em escala industrial. Além disso, a equipe acredita que se as plantas fossem transformadas em biorrefinarias integradas, ao produzir E1G e E2G, o rendimento por hectare de cana-de-açúcar poderia dobrar, de 8.000 L/ha para 16.000 L/ha.

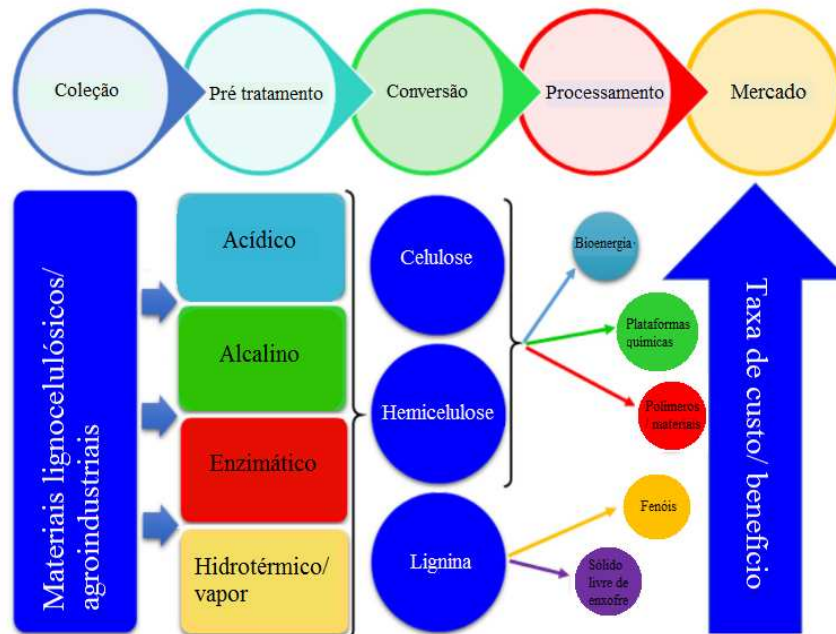
Contudo, mesmo que conhecidas as etapas físicas, químicas e biológicas, a produção de E2G deve sofrer alterações e evoluções com o processo de escalonamento industrial. Há um longo processo de aprendizagem a ser percorrido na transferência de novas tecnologias da escala piloto para a escala industrial, durante o qual deverá superar os riscos substanciais e as incertezas para que a difusão da tecnologia possa ocorrer satisfatoriamente.

1.2- Biorrefinaria lignocelulósica

O conceito de biorrefinaria se refere a uma indústria de multiprodutos que usa as frações de biomassa lignocelulósica para produzir energia, produtos químicos e subprodutos (Figura 2). Esse conceito tem despertado interesse em pesquisas devido à futura viabilidade econômica que ele pode oferecer ao mercado biobaseado, quando comparado somente ao cenário de produção de E2G e também frente à viabilidade atingida no processo de produção de E1G, com a cogeração de vapor e energia elétrica. Além disso, estima-se que a biorrefinaria lignocelulósica contorne os problemas das emissões líquidas de CO₂, uma vez que o uso de bagaço de cana para produção de E2G e bioprodutos de valor agregado retira parte dessa biomassa do processo de geração de energia para a planta e, acredita-se que futuramente a conversão da indústria de açúcar e E1G em biorrefinaria será o caminho mais sustentável a ser seguido por essas indústrias (SINDHU *et al.*, 2016). Adicionalmente, estima-se que o mercado mundial de produtos químicos movimente USD \$ 100 bilhões por ano, dos quais 3 % estão relacionados a

bioprodutos, ou derivados de biomassa lignocelulósica, o que representa uma oportunidade de mercado a ser perseguida pelo setor (VAZ, 2014).

Figura 2: Biorrefinaria lignocelulósica. Após o fracionamento, os componentes da biomassa são convertidos em diversos produtos de valor agregado. **Fonte:** Arevalo-Gallegos *et al.* (2017) (adaptada).



O principal desafio da biorrefinaria lignocelulósica é converter a biomassa de forma sustentável em produtos químicos, materiais, combustíveis e energia, satisfazendo as atuais restrições econômicas (FRANCO e GARZÓN, 2014). Como apresentado na Tabela 1, a biomassa pode gerar várias moléculas de valor agregado, a partir da celulose, hemiceluloses e lignina.

Tabela 1: Visão geral dos produtos que podem ser gerados em biorrefinaria lignocelulósica.

Produto alvo	Precursor	Rota de formação	Referência
Ácido succínico	Xilose (hemiceluloses)	Fermentação por <i>Actinobacillus succinogenes</i>	BORGES <i>et al.</i> , 2011; BRADFIELD, <i>et al.</i> 2016
Lipídeos	Hidrolisado de hemiceluloses	Fermentação por <i>Lipomyces starkeyi</i>	XAVIER <i>et al.</i> , 2017
Metano e hidrogênio (biogás)	Xilose (hemiceluloses)	Digestão anaeróbia por consórcio microbiano proveniente de lodo de esgoto	BAËTA <i>et al.</i> , 2016
Lignina fenol- formaldeído adesivo (LFFA) (adesivo)	Lignina	Substituição parcial do fenol pelo contido no resíduo da produção de E2G para formar LFFA	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
Ácido láctico	Glicose (celulose)	Fermentação por <i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	MORAES <i>et al.</i> , 2016
Xilo- oligossacarídeos (cultivo de probióticos)	Xilana (hemiceluloses)	Hidrólise enzimática das hemiceluloses	MANDELLI <i>et al.</i> , 2014
Vanilina	Lignina	Biotransformação por consórcio bacteriano isolado na natureza	HARSHVARDH AN <i>et al.</i> , 2017
Ramnolipídeos (biossurfactante)	Hemiceluloses	Fermentação por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LOPES <i>et al.</i> , 2017
Xilitol	Xilose (hemiceluloses)	Fermentação por <i>Candida guilliermondii</i>	ARRUDA <i>et al.</i> , 2017

O ácido succínico é uma molécula precursora de muitos produtos químicos industrialmente importantes, e possui larga aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e agrícola. Atualmente, a produção comercial do ácido succínico é pelo processo químico do anidrido maleico, derivado do petróleo, o que limita o uso do

composto em várias aplicações devido ao custo elevado de produção (BORGES e PEREIRA, 2011).

Os biossurfactantes são moléculas valiosas que possuem diversas aplicações ambientais, como na recuperação aprimorada de petróleo e também como farmacêuticos e terapêuticos (LOPES *et al.*, 2017). Marcelino *et al.* (2017) produziram o biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico e mostraram o seu potencial para a produção de biolarvicidas contra o *Aedes aegypti*, vetor da doença dengue.

Os lipídeos a partir da biomassa são grandes atrativos para a indústria devido à composição semelhante a de óleos vegetais. Ricos em ácidos poli-insaturados, como o ácido linolênico, são frequentemente usados em suplementos dietéticos e nutrição infantil (RUAN *et al.*, 2012). Na mesma linha, estão os xilo-oligossacarídeos, oligômeros contidos nos licores do hidrolisado hemicelulósico, que além de serem moléculas precursoras da xilose, são utilizados para cultivar microrganismos benéficos para o intestino humano, chamados probióticos (BURUIANA *et al.*, 2017).

O biogás é utilizado em caldeiras industriais para a produção de energia. Tem sido apontado como uma excelente destinação para as pentoses contidas nos materiais lignocelulósicos devido à dificuldade técnica de se fermentar esses açúcares a E2G de forma economicamente viável (KUMAR *et al.*, 2016). Além disso, ao suplementar o sistema de cogeração de energia a partir de biogás, essa fonte adicional de energia aumenta a disponibilidade de bagaço de cana para a produção de E2G (DIAS *et al.*, 2012).

A vanilina vem despertando interesse científico devido à sua aplicação na produção de polímeros, utilizados na produção de compósitos, poliésteres, dentre outros (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, é gerada a partir da lignina, pouco utilizada para a produção de moléculas de valor agregado até o presente momento. Sua pouca utilização também advém da competição pelo seu uso na geração de energia em caldeiras devido à sua elevada capacidade calorífica.

O ácido láctico é amplamente utilizado em indústrias químicas, farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, além de ser o alicerce para produzir ácido poliláctico, que é um biopolímero alternativo ao plástico sintético, sustentável devido à sua biodegradabilidade (MORAES *et al.*, 2016).

O xilitol é um adoçante com capacidade edulcorante semelhante à sacarose, porém com menor teor calórico (2,4 kcal/g comparado com 4 kcal/g de sacarose). Este adoçante possui características interessantes devido às suas propriedades comerciais anticariogênicas e metabolismo independente da insulina (FRANCO; GARZÓN, 2014), sendo, portanto, comercialmente valioso.

Por tudo isso, entende-se que o fracionamento eficaz da biomassa traz grandes vantagens ao setor industrial e uma grande oportunidade econômica e ambiental.

2- Estrutura da biomassa lignocelulósica

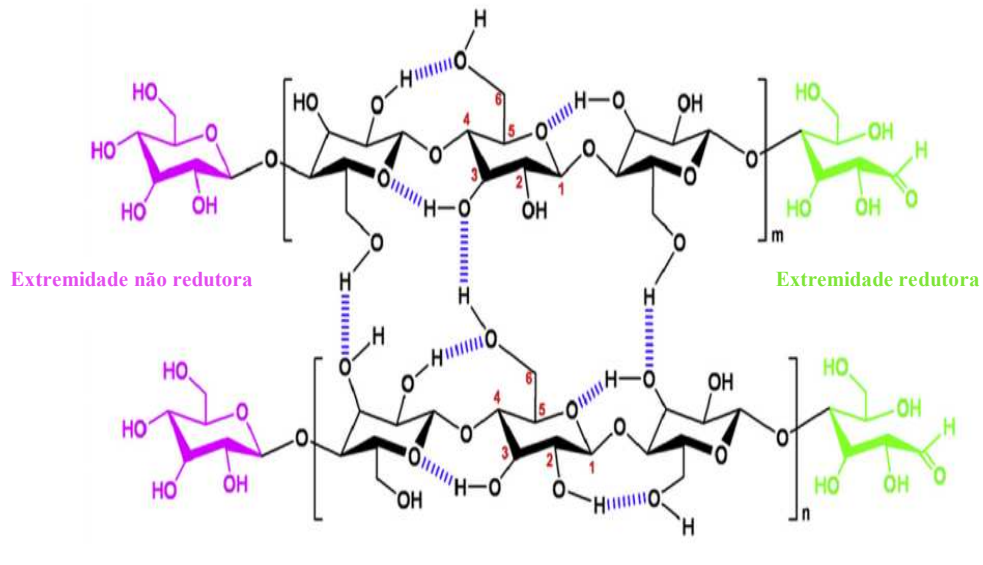
A biomassa lignocelulósica é constituída por resíduos florestais, agrícolas, agroindustriais e alimentares. É uma fonte de energia abundante, renovável e de baixo custo. Como a composição química da biomassa lignocelulósica consiste principalmente de açúcares na forma polimérica (celulose e hemiceluloses) e lignina, esses componentes químicos podem ser reciclados e usados para a produção de diversos produtos de valor agregado, como etanol, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros.

2.1- Celulose

A celulose é o principal componente estrutural da parede celular dos vegetais e responsável por muitos de seus traços distintivos. É um polímero insolúvel em água e possui estrutura química composta por unidades repetitivas de celobiose, que são dímeros de β -D-anidroglicopirranose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (ZHANG *et al.* 2008). Durante a biossíntese, as cadeias lineares e extensas da celulose são alinhadas lado a lado, criando fibras de grande resistência mecânica, sendo por isso comparada à resistência da tensão do aço (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007).

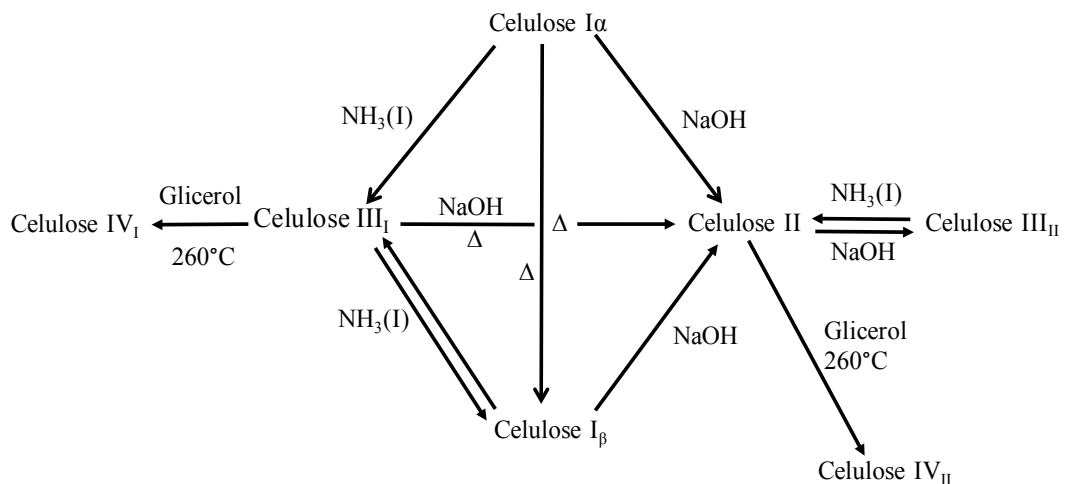
A celulose apresenta duas regiões, chamadas de cristalina e amorfa, interfaciadas por regiões de grau de cristalinidade inferior, mantidas de forma coesa por meio de ligações de hidrogênio. A região cristalina, também chamada de região organizada, é formada por cadeias paralelamente dispostas. A região amorfa, também chamada de região desorganizada, é formada por unidades em que as ligações intermoleculares são dispostas de maneira irregular, não tão coesa quanto na região mais organizada. O grau de cristalinidade da celulose (geralmente na faixa de 40 % a 60 %) depende da sua origem e tipo de processamento e está relacionado à baixa acessibilidade das enzimas (SMUGA-KOGUT *et al.*, 2016). Como observado na Figura 3, cada extremidade da cadeia de celulose apresenta um grupo redutor, que pode alternar entre uma estrutura alifática e cíclica, com um grupo carbonila em C-1 e um grupo não redutor em C-4.

Figura 3: Representação esquemática da estrutura química e das ligações intra- e intermoleculares de hidrogênio na celulose cristalina. **Fonte:** LIN *et al.*, 2014 (adaptada).



Estudos mostraram que existem 6 tipos de celulose: I, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}. A celulose I, também chamada de nativa, é a principal forma encontrada na natureza e ocorre na forma de dois alomorfos denominados I_α e I_β. As demais, são obtidas artificialmente por tratamentos químicos ou térmicos, como demonstrado na Figura 4. (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007).

Figura 4: Transformação da celulose em vários polimorfos. **Fonte:** KLEMM *et al.*, 2002 (adaptada).



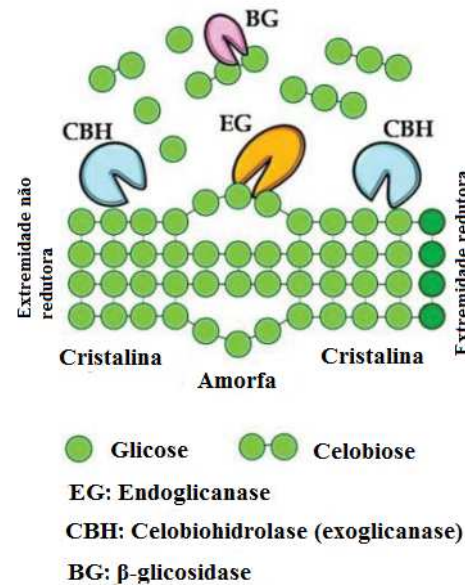
Além da celulose I, a celulose II é a forma cristalina mais importante da celulose do ponto de vista técnico e comercial. É obtida pelo chamado processo de mercerização, isto é, por imersão da celulose em solução aquosa de NaOH (10 % a 20 %, m v⁻¹) seguida por neutralização ou lavagem do intermediário chamado álcali de celulose. A modificação cristalina da celulose III é obtida tratando-se a celulose nativa com amônia líquida (abaixo de 30 °C) ou uma amina orgânica, seguida por lavagem com álcool. A diferença entre a celulose III_I e III_{II} é por pequenas dimensões da rede. A celulose IV é formada pelo tratamento da celulose II ou III com glicerol líquido em alta temperatura (KLEMM *et al.*, 2002).

2.1.1- Hidrólise enzimática da celulose

A obtenção de E2G a partir da celulose envolve uma importante etapa de hidrólise do polímero a glicose. Esse processo pode ser realizado, eficientemente, via hidrólise enzimática, por um conjunto de enzimas chamadas celulasas (Figura 5). Segundo Mandelli *et al.* (2014), as principais vantagens de se utilizar enzimas ao invés de ácido, no processo de hidrólise são as condições mais suaves de reação, geração mínima de resíduos indesejáveis e especificidade do produto formado.

As celulasas pertencem às famílias de hidrolases glicosídicas e de acordo com o sistema de classificação tradicional, são divididas em três classes; exo-1,4-β-D-glicanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que progressivamente se movem ao longo da cadeia de celulose e clivam as unidades de celobiose das extremidades; endo-1,4-β-D-glicanases (EG) (EC 3.2.1.4), que hidrolisam aleatoriamente ligações β-1,4-glicosídicas internas na cadeia de celulose; 1,4-β-D-glicosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose a glicose e também clivam as unidades de glicose presentes nos celooligosacarídeos.

Figura 5: Modelo esquemático da hidrólise enzimática da celulose. **Fonte:** Madadi *et al* (2017) (Adaptada)



Existem numerosos microrganismos bacterianos e fúngicos envolvidos na produção de celulasas. Devido à capacidade de produzir enzimas extracelulares, as celulasas fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas nas aplicações industriais. O sistema de produção de celulasas fúngicas trabalha com os fenômenos de restrição/indução, onde as fontes de carbono, facilmente metabolizadas, restringem e induzem a secreção de enzimas de acordo com a composição (MADADI, 2017).

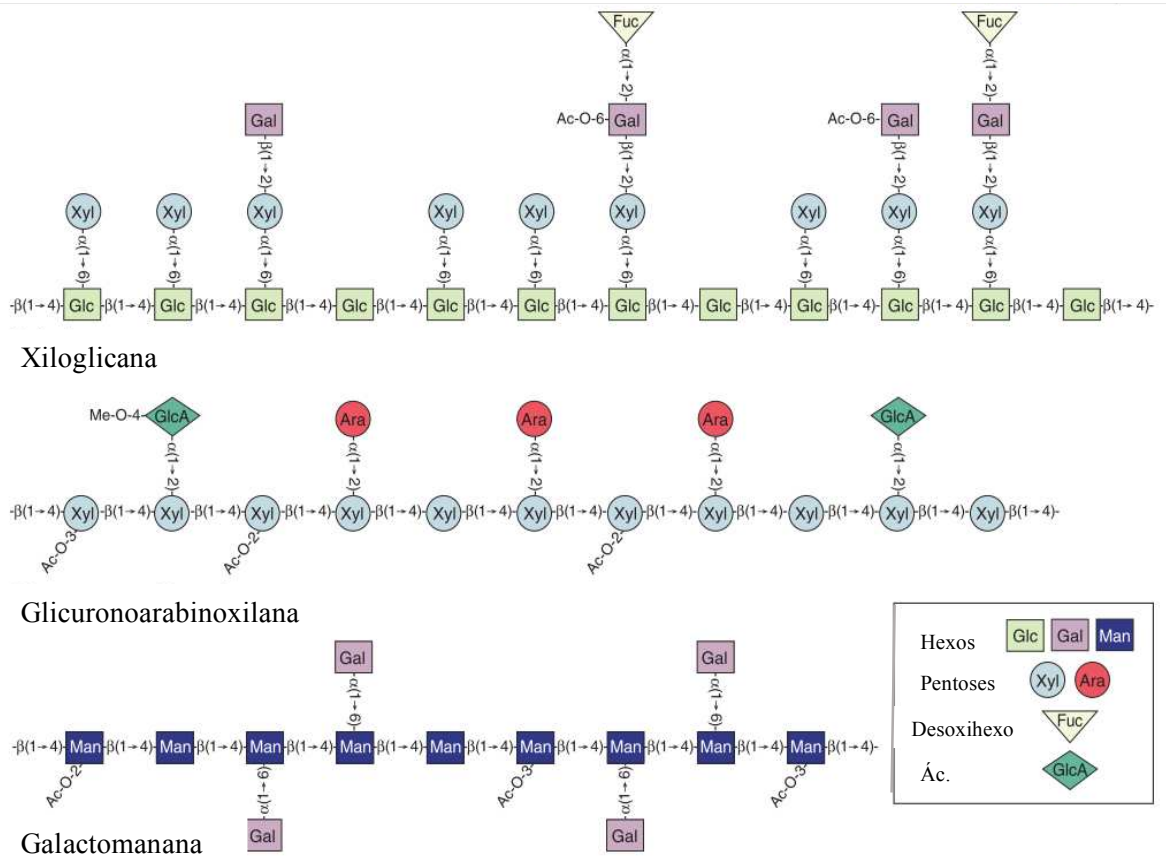
Um dos métodos técnicos favoráveis para a redução do custo de processamento é a produção de celulasas nos resíduos agroindustriais por meio da fermentação em estado sólido (SSF). Nestes resíduos de baixo custo, os carboidratos atuam como uma fonte de carbono para o crescimento de fungos. Vários pesquisadores relataram diversos substratos para a produção de celulasas, como palha de arroz, palha de trigo, palha de sorgo, espiga de milho, flor de algodão, resíduo de mandioca e casca de amendoim (ARORA *et al.* 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020)

2.2- Hemiceluloses

As hemiceluloses são compostas por polissacarídeos de cadeias curtas e constituem a principal fração não celulósica dos polissacarídeos, representando entre 15 a 35 % da biomassa vegetal. Está localizada interfaciada à lignina e à celulose (FAN *et al.* 1987). Em seu estado natural, existe em uma forma amorfa e pode conter pentoses (β-D-xilose, α-L-arabinose), hexoses (β-D-manose, β-D-glucose, α-D-galactose) e/ou ácidos

urônicos (ácidos α -D-glicurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico), sendo os açúcares da cadeia principal unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4). Outros açúcares, como α -L-ramnose e α -L-fucose podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila dos açúcares podem ser parcialmente acetilados nas posições C-2 e C-3. Os homopolímeros de xilose, os chamados homoxilanos, ocorrem apenas em algas (algas vermelhas e verdes) (GÍRIO *et al.*, 2010) (Figura 6).

Figura 6: Exemplos de estruturas de hemiceluloses presentes nas paredes celulares, incluindo diversos monossacarídeos em cadeias laterais, além da presença de grupos acetila. **Fonte:** PAULY *et al.* (2008) (adaptada).



Devido à estrutura amorfa, com cadeias curtas, as hemiceluloses podem ser facilmente solubilizadas e hidrolisadas em água a temperaturas acima de 150 °C; além disso, a hidrólise pode ser catalisada por ácido ou base empregando temperaturas ligeiramente mais baixas (TOOR *et al.*, 2011).

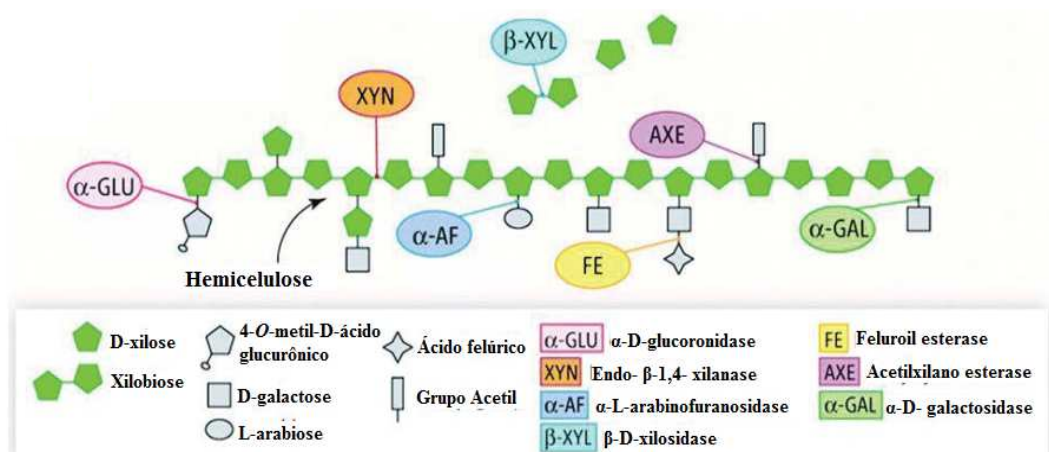
A classificação e localização das cadeias principais das hemiceluloses dependem do tipo de açúcar que as constitui (ver Figura 6). As xilanas (pentoses) estão geralmente disponíveis em grandes quantidades como subprodutos das indústrias florestais, agrícolas, agroindústrias, madeira e papel e celulose. As xiloglicanas estão localizadas na

parede primária da célula vegetal e são mais interligadas à celulose. Os polímeros de xilana, como as arabinoxilanas são os principais componentes hemicelulósicos do bagaço de cana. As galactomananas estão presentes na parede secundária das madeiras moles, enquanto nas madeiras duras ocorrem em pequenas quantidades (SUN *et al.*, 2004; GÍRIO *et al.*, 2010).

2.2.1- Hidrólise enzimática da xilana

Para a completa degradação da xilana são necessárias enzimas endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações internas na cadeia de xilana e β -D-xilosidases (CE 3.2.1.37), que atacam a extremidade não redutora da xilana, liberando xilose. Além dessas, as α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139), acetilxilano esterases (EC 3.1.1.72) e feluroil esterases (EC 3.1.1.73) atuam nas cadeias laterais da macromolécula e são chamadas enzimas acessórias (Figura 7) (MOREIRA e FILHO, 2016).

Figura 7: Modelo esquemático da hidrólise enzimática da xilana. **Fonte:** Madadi *et al.* (2017) (Adaptada).



Várias pesquisas têm concentrado esforços na busca por um coquetel enzimático que seja eficaz e de baixo custo. Falkoski *et al.* (2013) cultivaram o fungo *Chrysosporthe cubensis* em farelo de trigo (estado sólido) e obtiveram altas atividades de xilanase ($362,38 \text{ IU g}^{-1}$). A hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por pré-tratamento alcalino e sacarificado com o extrato enzimático bruto resultou na liberação de 288,7 mg de xilose por grama de biomassa, enquanto as enzimas comerciais resultaram em apenas 62,1 mg de xilose por grama de biomassa. Já Visser *et al.* (2013), mostraram que a mistura (50:50) dos coquetéis enzimáticos dos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* foi capaz de promover a conversão de 90 % de xilana a xilose.

2.3- Lignina

A lignina é o termo genérico para um grande grupo de macromoléculas aromáticas resultantes do acoplamento desidrogenativo de unidades fenilpropanóides. Estas macromoléculas são depositadas predominantemente na lamela média (e em canto de célula) e em menor proporção nas paredes celulares primária e secundária, tornando as células vegetais rígidas e mais hidrofóbicas (VANHOLME *et al.*, 2010). Dependendo das espécies de plantas (plantas anuais, madeiras moles ou madeiras duras), do tecido vegetal, da idade e das condições de crescimento, o teor de lignina varia normalmente entre 15 % e 30 % e em alguns casos até 41 % (Tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo de lignina em espécies selecionadas e tecidos de planta.

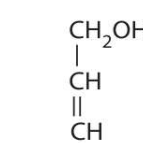
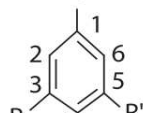

Espécie vegetal	Tipo de planta/amostra	Conteúdo de lignina (%)
Madeira mole	Madeira normal	25–33
	Madeira de compressão	34–41
<i>Picea abies</i>	Abeto norueguês	27,3
<i>Pinus radiata</i>	Pinheiro de monterey	26,8
<i>Pinus sylvestris</i>	Pinheiro escocês	26,3
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Abeto de Douglas	27,2
Madeira dura	Zona temperada	18–25
	Zona tropical	20–32
	Madeira de tensão	16–20
<i>Betula verrucosa</i>	Vidoeiro europeu	19,4
<i>Fagus sylvatica</i>	Faia europeia	23,8

<i>Quercus rubra</i>	Carvalho vermelho americano	21,8
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto comum	21,9
Plantas anuais		
<i>Bambusa</i> spp.	Bamboo	20–24
<i>Saccharum officinarum</i>	Bagaço de cana	18–20
<i>Poaceae</i> spp.	Palha de cereais	6–24
<i>Triticum aestivum</i>	Palha de trigo	16,7–18
<i>Avena sativa</i>	Palha de aveia	17,5
<i>Zea mays</i>	Palha de milho	10–17
<i>Secale cereale</i>	Palha de centeio	19,0
<i>Brassica napus</i>	Palha de colza	19–22
<i>Oryza sativa</i>	Palha de arroz	11,9
<i>Linum usitatissimum</i>	Espigas de linho (trigo)	22,3

Fonte: WINDEISEN & WEGENER (2012) (Adaptada).

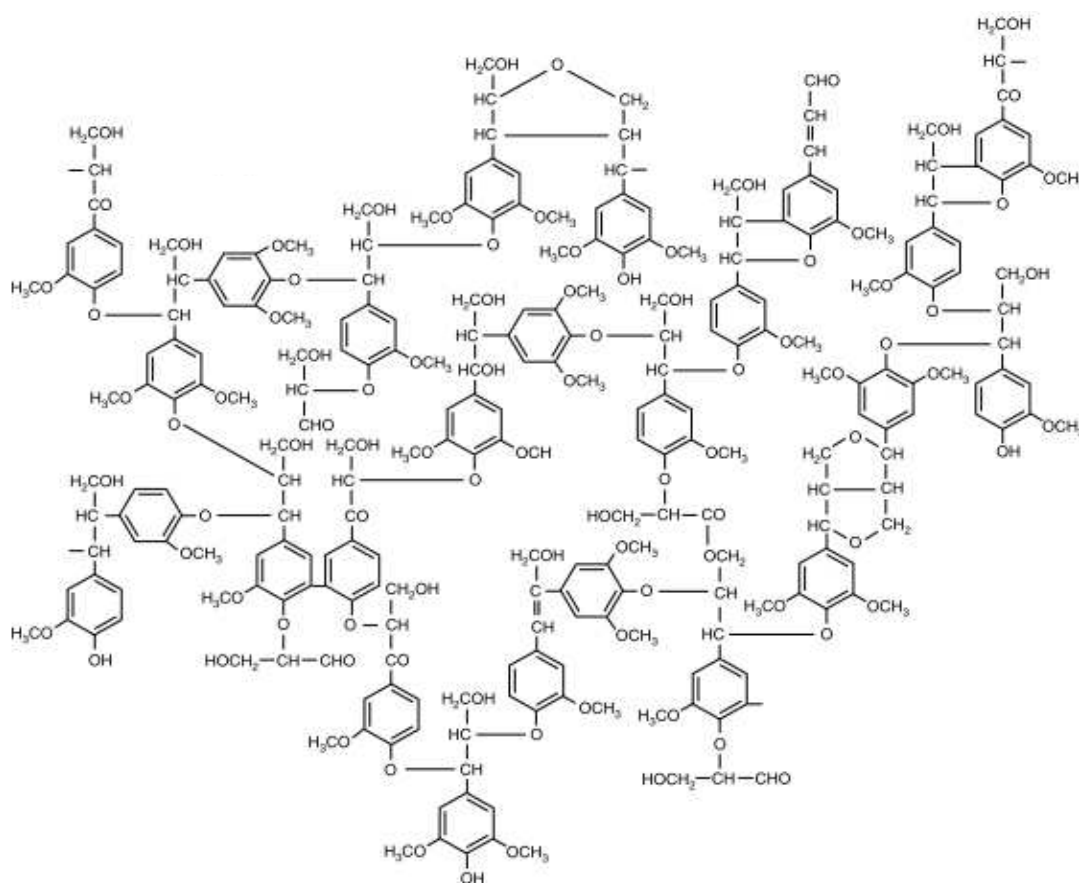
Os principais blocos de construção da lignina são o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, como apresentado na Figura 8. Estes monômeros diferem nas substituições nas posições 3 e 5 do anel aromático e por isso contribuem para a variação na composição da lignina entre os táxons e espécies. O principal monômero para ligninas de madeira mole é o álcool coniferílico, que tem um grupo metoxila na posição C-3. As ligninas de madeira dura possuem dois monômeros principais: o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, que possuem grupos metoxila nas posições C-3 e C-5, respectivamente. O terceiro monômero, o álcool *p*-cumarílico, é mais proeminente em gramíneas e madeira de compressão (HEITNER *et al.* 2010).

Figura 8: Blocos monoméricos constituintes da lignina. A presença e localização desses depende da fonte vegetal. **Fonte:** Adaptação de HEITNER *et al.* (2010).

	Substituintes	Nome	Localização
	R = R' = H	Álcool <i>p</i> -cumarílico	Madeira de compressão, gramíneas
	R = H, R' = OCH ₃	Álcool coniferílico	Madeira mole, madeira dura
	R = R' = OCH ₃	Álcool sinapílico	Madeira dura

A lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa, sem uma regularidade de ligação entre suas unidades precursoras (Figura 9). As ligações dominantes entre os resíduos de fenilpropano são do tipo β -O-4 e α -O-4, no entanto, uma série de ligações do tipo éter (γ -O- γ , α -O- γ , 1-O-4 e 4-O-5) e ligações carbono-carbono (β -5, β -1, 5-5, β - β , α - β , β -6, 1-5 e 6-5) podem estar presentes, como evidenciado na Figura 10. A lignina contém grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, mas, como resultado da estrutura química tridimensional, a forma nativa se apresenta hidrofóbica. Sendo responsável, portanto, por permitir o transporte de água na parede celular (WINDEISEN & WEGENER, 2012).

Figura 9: Representação esquemática da estrutura da lignina. Fonte WATKINS *et al.* (2015).



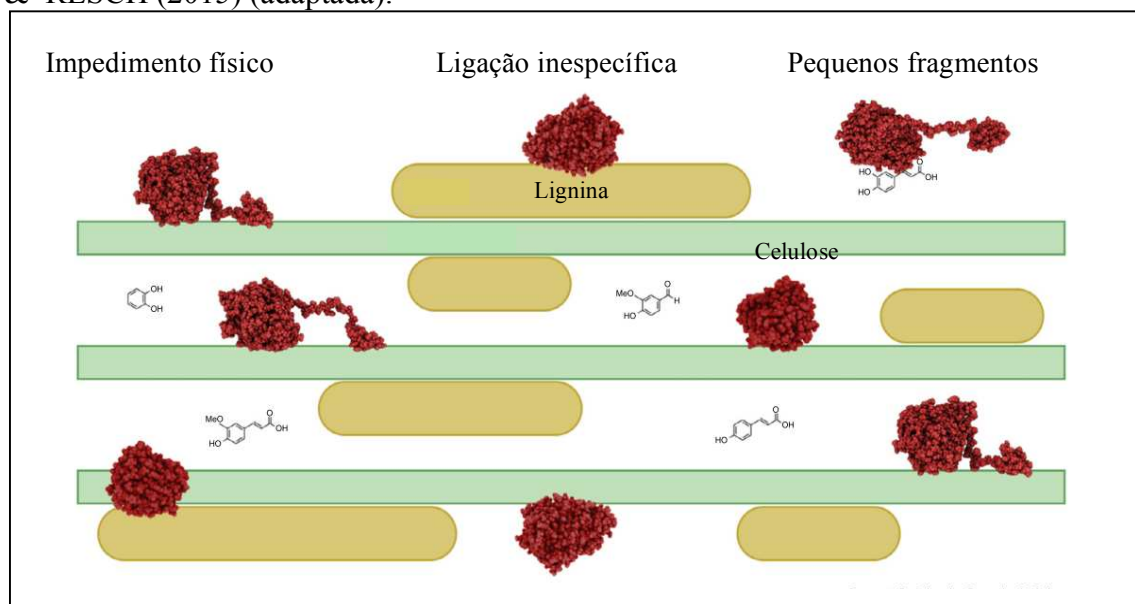
A lignina está sempre associada aos carboidratos, em particular às hemiceluloses, por meio de ligações covalentes no α -carbono e C-4 do anel benzênico, nos chamados complexos de lignina-carboidrato (CLC). Devido à complexidade dessas estruturas, os métodos de isolamento da lignina removem parte da fração de carboidratos, diminuindo a seletividade do processo e a fração insolúvel dos carboidratos. Esses fatores somados à falta de regularidade nas ligações químicas unindo as unidades fenilpropânicas

representam uma grande barreira para a elucidação da estrutura química da lignina e sua utilização eficiente para a geração de produtos químicos de valor agregado em uma biorrefinaria lignocelulósica (GHAFAR *et. al.*, 2013).

2.3.1- Inibição enzimática causada pela lignina

Estudos anteriores estabeleceram a hipótese de que a presença da lignina pode causar impedimento estérico (bloqueio físico que impede o contato da enzima com o substrato de interesse) e adsorção improdutivo das enzimas (interação hidrofóbica, interação eletrostática e/ou ligação de hidrogênio), como esquematizado na Figura 10. Entretanto, acredita-se que as interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas sejam as principais forças que inibem as enzimas lignocelulolíticas durante o processo de sacarificação da biomassa (KUMAR *et al.*, 2012).

Figura 10: Inibição enzimática causada pela lignina. Lignina (amarela) inibe as celulasas (vermelhas) impedindo o acesso à celulose (verde). Ligação inespecífica das enzimas à lignina e aos fragmentos aromáticos, gerados após o pré-tratamento. **Fonte:** DONOHOE & RESCH (2015) (adaptada).



As interações hidrofóbicas podem acontecer devido à presença de um módulo de ligação a carboidrato (MLC) em diversas enzimas lignocelulolíticas. A afinidade de ligação MLC-celulose origina-se de interações de empilhamento de anéis hidrofóbicos (empilhamento π), que ocorrem entre os aminoácidos aromáticos e os anéis das moléculas de glicose, na celulose. Interações de empilhamento similares também poderiam ocorrer

com as estruturas aromáticas da lignina, fazendo a enzima se ligar primeiramente à lignina. Experimentos comprobatórios foram realizados por Rahikainen *et al.* (2013) que, submeteram a palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor à hidrólise por celobiohidrolases com presença e ausência do MLC. Os autores evidenciaram que as enzimas com presença de MLC tiveram mais afinidade pela lignina e por isso foram fortemente inibidas durante a sacarificação da biomassa, em comparação às celobiohidrolases com o domínio central.

Em contrapartida, como demonstrado por Kumar *et al.* (2012), os rendimentos de hidrólise podem ser ampliados se houver sobrecarga de enzimas. Esses experimentos mostraram que a ampliação de 5 para 200 FPU g⁻¹ de celulose foi capaz de promover a quase completa hidrólise da celulose inicial, sendo 16% observados no teste preliminar. Esses resultados indicam que parte da carga enzimática pode ter sido ocupada pelos sítios de ligação da lignina, enquanto a outra fração pôde atuar na hidrólise do material. No entanto, submeter a biomassa a um processo de deslignificação química pode ser uma alternativa mais viável em comparação ao aumento da carga enzimática devido ao elevado custo dos coquetéis enzimáticos.

3- Deslignificação alcalina

O pré-tratamento alcalino, ou deslignificação alcalina, promove uma eficiente remoção da lignina e a diminuição da cristalinidade da celulose. Esses fatores juntos, contribuem significativamente para o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos remanescentes. Além disso, o processo remove grupos acetila e várias substituições de ácido urônico nas hemiceluloses, que podem inibir os microrganismos na fermentação. Adicionalmente, possui custo relativamente baixo e grande eficiência energética se a recuperação do sódio na forma de óxido de sódio (Na₂O) é feita por meio da combustão do licor negro contendo a lignina em caldeiras (AGBOR *et al.*, 2011).

Em geral, os reagentes mais utilizados em pré-tratamentos alcalinos são hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) (CHANG *et al.*, 2017). Como evidenciado na Tabela 3, a deslignificação varia consideravelmente em função das condições de pré-tratamento como temperatura, concentração de álcali e tempo de residência.

Tabela 3: Vários reagentes usados em pré-tratamentos alcalinos de biomassas lignocelulósicas, suas condições e efeitos.

Catalisador		Tipo de reação e condição	Principal efeito
Hidróxido de sódio		0,5–10,0% NaOH, 60–180°C, 5–60 min, 10–30% de sólidos	Perda de 50% de hemiceluloses, 60–80% de deslignificação
Carbonato de sódio		1–30% Na ₂ CO ₃ , 60–180°C, 5–60 min, 10–30% de sólidos	Perda de 20–40% de hemiceluloses, 40–60% de deslignificação, fácil recuperação do Na ₂ CO ₃
Hidróxido de amônio		5–30% amônia, 30–210°C, 5–60 min, alta pressão (2–17 atm), 10–50% de sólidos	Perda de 10–50% de hemiceluloses, 0–80% de deslignificação, remoção por intumescimento e modificação da lignina
Amônia	Amônia anidra gasosa	Gás de amônia 25–80°C, ~72 h Aproximadamente 50% de sólidos (umidade ~50%)	Não necessita de lavagem, baixa carga de sólidos (50% de umidade), condições leves de reação
	Amônia anidra líquida	70–90°C, ~5 min, alta pressão (15–20 atm), amônia anidra, 60–90% de sólidos	Não solubiliza hemiceluloses e não remove lignina. Rápida evaporação e liquefação da amônia
Hidróxido de cálcio		25–130°C, 1 h–8 semanas 0,05–0,15 g Ca(OH) ₂ /g de biomassa, 5–20% de sólidos	Perda de 20–40% de hemiceluloses, 60–80% de deslignificação, desacetilação. Requer baixa energia. Baixo custo

Fonte: KIM *et al.* (2016) (Adaptada).

Na indústria de celulose técnica, a deslignificação da madeira envolve a combinação de hidróxido de sódio (NaOH) e hidrossulfeto de sódio (NaSH), que promovem a hidrólise das ligações α - e β -aril-alquil-éter (C-O-C) em um processo denominado polpação kraft. Estima-se que a indústria de celulose técnica produza mais de 50 milhões de toneladas de lignina anualmente, no entanto, existe pouca aplicabilidade para essa lignina devido ao seu alto teor de enxofre (LI *et al.* 2017).

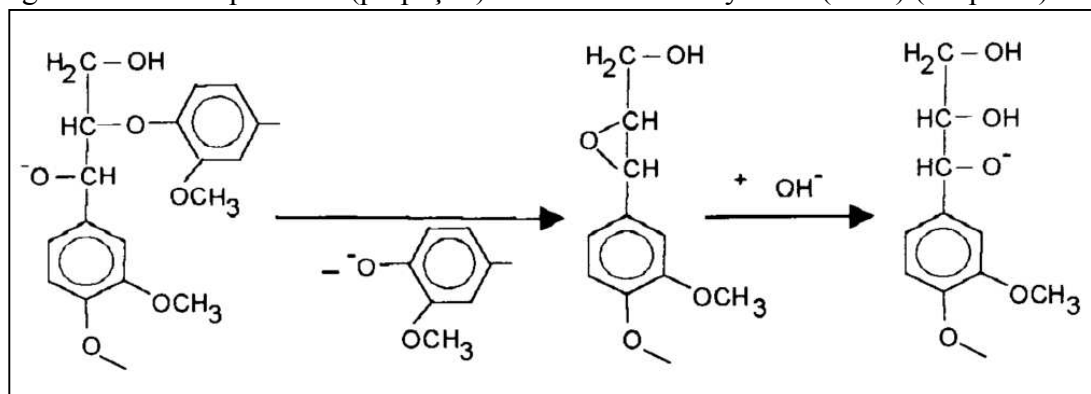
Segundo Lora *et al.* (2002) a lignina de alta qualidade, livre de enxofre, pode estimular o desenvolvimento de novas aplicações para a lignina, pois podem ser processadas a quente sem a liberação de odor, comumente observado no processo kraft. Por isso, oferecem maior versatilidade nas instalações de fabricação. Adicionalmente, são produtos poliméricos fenólicos que podem ser utilizados em aplicações de fixação térmica, como resinas fenólicas, epóxi e isocianato. Outra grande vantagem da lignina livre de enxofre está no fato de serem mais próximas da lignina nativa e por isso,

conservam suas propriedades antioxidante e antimicrobiana, que podem ser industrialmente exploradas.

Dessa forma, várias pesquisas têm empregado métodos de polpação menos severos, usando hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio como agente catalisador (ROSSBERG *et al.*, 2014). No entanto, segundo trabalho realizado por Chang *et al.* (2017), em um contexto de biorrefinaria, o hidróxido de sódio possibilita uma melhor remoção de lignina, uma maior conversão enzimática e uma recuperação mais eficiente da lignina no licor negro do que o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Durante o pré-tratamento alcalino ocorre, principalmente, a clivagem das ligações α - e β -aryl-alkyl éter da lignina, principalmente as mais abundantes, ou seja, as ligações β -O-4 e α -O-4. Esta reação fragmenta a macromolécula de lignina, levando ao aumento da quantidade de grupos hidroxila fenólicos. No licor de cozimento alcalino, os grupos fenólicos são ionizados e contribuem para a solubilidade dos fragmentos de lignina (DIMMEL & GELLERSTEDT, 2010) (Figura 11). Menezes *et al.* (2017) mostraram que a temperatura interfere ativamente no aumento das hidrólises dessas ligações (β -O-4 e α -O-4). Experimentos mostraram que a elevação da temperatura, de 130 °C para 170 °C, aumentou a hidrólise de 43 para 81 % no bagaço de cana, submetido a pré-tratamento com uma solução aquosa de NaOH 1,5 % ($m v^{-1}$) por 30 min. O mesmo trabalho também apontou uma mudança na composição química da lignina presente no licor de cozimento e, portanto, no destino de aplicação dessa macromolécula. A presença de maior conteúdo de *p*-hidroxifenila (H) e menor de siringila (S) indica uma possível aplicação em resinas fenólicas devido à maior reatividade para o formaldeído, nesse material, por exemplo.

Figura 11: Exemplo de mecanismo de clivagem das ligações β -O-4 da molécula de lignina durante o processo (polpação) soda. **Fonte:** Filley *et al.* (1999) (adaptada).



Embora o NaOH seja essencial para uma rápida polpação, a presença do composto é bastante prejudicial aos carboidratos. Durante as reações, podem ocorrer dissolução de

mais 50 % das hemiceluloses e 5-40 % da celulose, além da diminuição, significativa, no comprimento das cadeias de celulose e hemiceluloses, que está relacionado às propriedades de resistência da polpa (DIMMEL & GELLERSTEDT, 2010). No trabalho de Nascimento *et al.* (2016a), o pré-tratamento alcalino promoveu a dissolução de 67,6% e 14,6 % das frações de hemiceluloses e celulose, respectivamente. A perda de carboidratos reflete diretamente no processamento da biomassa pré-tratada na biorrefinaria lignocelulósica, uma vez os carboidratos são os principais precursores dos produtos gerados.

Esses aspectos negativos da polpação alcalina motivou a utilização da antraquinona (AQ), um aditivo químico capaz de promover o aumento na seletividade da deslignificação, promovendo a remoção da lignina e a diminuição na perda dos carboidratos, durante o processo de cozimento (soda-AQ). Isso pode ser atribuído principalmente ao mecanismo do ciclo redox entre antraquinona oxidada (AQ) e reduzida (antra-hidroquinona). O primeiro trabalho, patenteado na década de 70, mostrou que a suplementação com antraquinona, ao processo soda, possibilitou superar o rendimento de celulose do processo kraft em madeira mole (HOLTON, 1977). Posteriormente, também foi observado que apenas 0,25 % (m m⁻¹) de antraquinona foi capaz de igualar as taxas de deslignificação entre os processos kraft e soda-AQ (KUBES *et al.*, 1980). Atualmente, o processo soda-AQ também tem sido estudado em deslignificação da biomassa lignocelulósica (KHRISTOVA *et al.*, 1998; SARWAR JAHAN *et al.*, 2012), e por isso pode ser utilizado em um contexto de biorrefinaria.

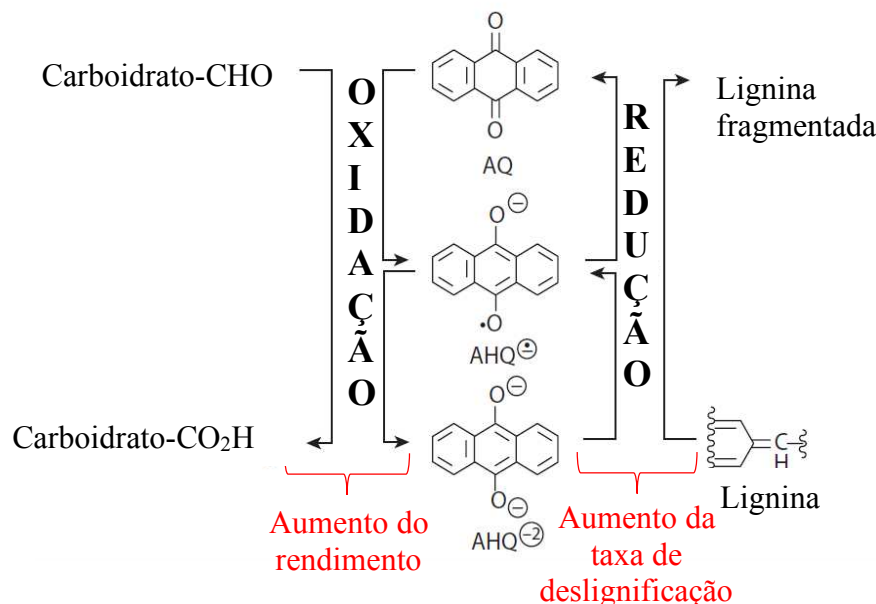
4- Pré-tratamento soda-AQ

A preservação da fração de carboidratos garante uma maior possibilidade de gerar produtos de valor agregado, além de permitir a obtenção de uma lignina mais pura no licor negro. A antraquinona forma um sistema redox, acelera a clivagem das ligações β -O-4 na lignina e oxida as extremidades dos carboidratos (DE MENEZES *et al.*, 2017).

Durante o ciclo redox, a antraquinona promove a oxidação dos grupos aldeídos a ácidos aldônicos, na extremidade redutora das cadeias de carboidratos, estabilizando-os e evitando posterior degradação. Ao mesmo tempo, a antra-hidroquinona (AHQ) (antraquinona reduzida) reduz a lignina, acelerando a deslignificação (Figura 12). Como a AQ é pouco solúvel em meio alcalino, sua eficácia durante a polpação pode ser limitada por muitos fatores, principalmente pela transferência de massa. Por isso, a taxa de

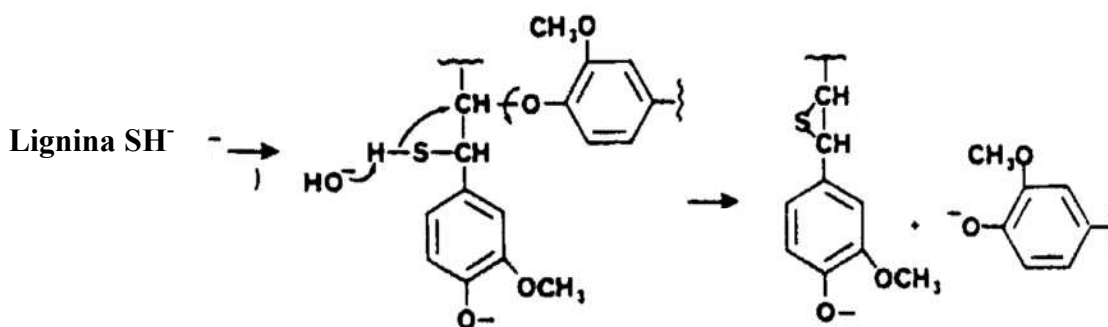
formação da AHQ é de extrema importância, uma vez que torna a molécula mais solúvel no meio reacional, acelerando a deslignificação (CHAI *et al.*, 2007).

Figura 12: Ciclo redox proposto para explicar a ação catalítica da antraquinona durante a polpação. **Fonte:** DIMMEL e GELLERSTEDT (2010) (adaptada).



Uma das teorias mais aceitas para efetividade da AQ na deslignificação, envolve o mecanismo semelhante ao que acontece durante a polpação kraft, promovido pelo íon hidrossulfeto (SH⁻). Nesse processo, acredita-se que o íon SH⁻ se ligue ao C_α da lignina e auxilie na clivagem da ligação C_β-aril éter, por deslocamento de grupo vizinho (Figura 13) (DIMMEL e DONALD, 1985). Uma vez que no processo soda-AQ, a antraquinona se liga à lignina, esse mecanismo pode explicar a similaridade nas taxas de deslignificação nos dois processos, observada anteriormente (KUBES *et al.*, 1980).

Figura 13: Exemplo de mecanismo da deslignificação na polpação kraft envolvendo a ligação do íon SH⁻ aos fragmentos de lignina e a consequentemente a fragmentação da lignina. **Fonte:** DIMMEL e DONALD (1985) (adaptada).



Além da capacidade de transferência de elétrons, a antraquinona é uma molécula bastante estável em meio alcalino e em elevadas temperaturas (DIMMEL e DONALD, 1985). Segundo Chai *et al.* (2007), dois fatores são de extrema importância para o sucesso da polpação soda-AQ, sendo: 1) a adsorção da AQ na biomassa, que desempenha um importante papel na deslignificação, e é facilitada em temperaturas mais amenas; 2) presença de grandes quantidades de lignina e carboidratos no licor de cozimento, que pode limitar os ciclos redox apenas na fração solúvel, afetando a ação da AQ na fração sólida da biomassa.

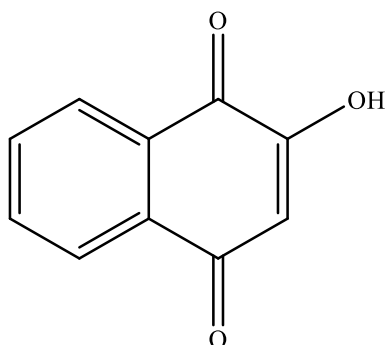
Dessa forma, Rocha *et al.* (2013) obtiveram uma degradação da celulose 32,2% menor no pré-tratamento soda-AQ em comparação com o pré-tratamento sem o mediador redox. Além disso, os melhores rendimentos foram obtidos nas temperaturas mais baixas testadas, o que possibilitou a redução da recalcitrância do material, com solubilização dos fragmentos de lignina de baixa massa molar e baixa degradação da celulose.

Segundo Francis *et al.* (2008), os aspectos positivos do processo soda/antraquinona sem enxofre (SAQ) estão ligados, principalmente, à melhoria da eficiência energética. Em contrapartida, o menor brilho da polpa após o branqueamento é a desvantagem mais significativa. Enquanto que em um contexto de biorrefinaria, mesmo obtendo preservação de 12 % a mais da fração de carboidratos, Nascimento *et al.* (2016) mostraram que o principal problema é a inibição das enzimas lignocelulolíticas, causada pela antraquinona ainda presente na fração sólida. Experimentos mostraram que o pré-tratamento sem a presença do aditivo, (a 130 °C, 1,5 % (m v⁻¹) de NaOH, 30 min), apresentou um rendimento de hidrólise enzimática 3 % maior. Em contrapartida, esse efeito foi potencializado para 15,6 % quando o processo aconteceu a 170°C.

5- Mediador redox 2-hidróxi-1,4-naftoquinona

A 2-hidróxi-1,4-naftoquinona (HNQ), também conhecida como lausona (lawsone), é uma molécula natural, extraída da planta *Lawsonia inermis*. Pertencente ao grupo das quinonas (como a antraquinona), possui dois átomos de oxigênio ligados ao anel naftalênico (nos carbonos das posições 1 e 4) para formar o grupo 1,4-naftoquinona contendo um grupo hidroxila na posição 2 (Figura 14).

Figura 14: Estrutura de Lausona (2-hidróxi-1,4-naftoquinona), corante natural da Henna, encontrado nas folhas da planta *Lawsonia inermis*. **Fontes:** NOHYNEKA *et al.* (2004) (adaptada) e Medicinalplants (website).



Atualmente, o potencial redox da Lausona tem sido empregado na redução de corantes azo presentes nos efluentes da indústria têxtil, o que resulta em uma descoloração significativa sem adicionar quaisquer substâncias ambientalmente problemáticas às águas residuais (ENCINAS-YOCUPICIO *et al.*, 2006). É uma molécula natural, comercialmente disponível e comumente utilizada (HIJJI *et al.* (2012). Até o presente momento, nenhum trabalho explorou o potencial redox, dessa molécula no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Nesse contexto, o presente estudo propõe a utilização da lausona durante os processos de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana para a produção de etanol de segunda geração, visando potencializar a deslignificação e a preservação dos carboidratos, sem prejudicar a hidrólise enzimática e os microrganismos fermentadores.

6- Referências Bibliográficas

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015.

ARRUDA, P. V. de; SANTOS, J. C. dos; RODRIGUES, R. de C. L. B.; SILVA, D. D. V. da; YAMAKAWA, C. K.; ROCHA, G. J. de M.; JÚNIOR, J. N.; PRADELLA, J. G. da C.; ROSSELL, C. E. V.; FELIPE, M. das G. de A. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 47, p. 297–302, 2017.

BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; FILHO, J. G. B.; ADARME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. de. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 436–446, 2016.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. *Ministério de minas e energia*. 2017. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>> Acesso em dezembro de 2017.

BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO (BNDES). De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar—uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. Disponível em <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/4283>> acesso em dezembro de 2017

BORGES, E. R.; PEREIRA, N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 1001–1011, 2011.

BRADFIELD, M. F A; NICOL, W. Continuous succinic acid production from xylose by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016.

BURUIANA, C. T.; GÓMEZ, B.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G. Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT - Food Science and Technology*, v. 77, p. 449–459, 2017.

CHAI, X-S.; SAMP, J.; HOU, Q. X.; YOON, S.-H.; ZHU, J. Y. Possible mechanism for anthraquinone species diffusion in alkaline pulping. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 46, n. 15, p. 5245–5249, 2007.

CHANG, M.; LI, D.; WANG, W.; CHEN, D.; ZHANG, Y.; HU, H.; YE, X. Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments on the enzymatic hydrolysis and lignin recovery of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 244, p. 1055–1058, 1 nov. 2017.

CHEN, H-Z; LI, Z-Y; LIU, X-Y; TIAN, Y-M; YANG, L.; WANG, Z-C. Depolymerization of renewable resources-lignin by sodium hydroxide as a catalyst and its applications to epoxy resin. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 26, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), 2017. Disponível em

<<https://www.conab.gov.br>> acesso em dezembro de 2017

DANTAS, Guilherme A.; LEGEY, Luiz F L; MAZZONE, Antonella. Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 21, p. 356-364;

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E.V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, v. 103, n. 1, p. 152–161, 2012.

DIMMEL, D. R. Electron transfer reactions in pulping systems (i): Theory and applicability to anthraquinone pulping. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 5, n. 1, p. 1–14, 1985.

DIMMEL, D. R; GELLERSTEDT, G. Lignin and lignans Advances in Chemistry. *Lignin and lignans Advances in Chemistry*. [S.l: s.n.], 2010. p. 1–636.

DONOHUE, B. S.; RESCH, M. G. Mechanisms employed by cellulase systems to gain access through the complex architecture of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 29, p. 100–107, 2015.

ENCINAS-YOCUPICIO, A. A.; RAZO-FLORES, E.; Sánchez-Díaz, F.; SANTOS, A. B. dos; FIELD, J.A.; CERVANTES, F. J. Catalytic effects of different redox mediators on the reductive decolorization of azo dyes. *Water Science and Technology*, v. 54, n. 2, p. 165–170, 2006.

EPE, Ministério de Minas e Energia. Cenários de Oferta de Etanol e Demanda do Ciclo Otto: versão estendida 2030. p. 29, 2017. Disponível em: <https://goo.gl/rMkOKf>, acesso em dezembro de 2019;

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N. de; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. de. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 296–305, 2013.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. *Cellulose hydrolysis. Volume 3*. United States: Springer-Verlag, agosto 1977 .

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2007.

FILLEY, T. R.; MINARD, R. D.; HATCHER, P. G. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis: Proposed mechanisms based upon the application of ¹³C-labeled TMAH to a synthetic model lignin dimer. *Organic Geochemistry*, v. 30, n. 7, p. 607–621, 1999.

FRANCIS, R.C.; BOLTON, T.S.; ABDOULMOUMINE, N.; LAVRYKOVA, N.; BOSE, S.K. Positive and negative aspects of soda/anthraquinone pulping of hardwoods. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 17, p. 8453–8457, 2008.

FRANCO, T. T.; GARZÓN, C. L. New business opportunities in the sugar-alcohol

industry: alcohol chemistry and biorefineries. *Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability.*, São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2014. v. 17. p. 761–772.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 2007, v. 108 p. 41-65.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, v. 57, p. 264–279, 2013.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

HARSHVARDHAN, K.; SURI, MRINALY; GOSWAMI, AMRIT; GOSWAMI, TRIDIP;. Biological approach for the production of vanillin from lignocellulosic biomass (*Bambusa tulda*). *Journal of Cleaner Production*, v. 149, p. 485–490, 2017.

HIJJI, Y. M.; BARARE, B.; ZHANG, Y.. Lawsone (2-hydroxy-1,4- naphthoquinone) as a sensitive cyanide and acetate sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 169, p. 106–112, 2012.

HOLTON, H. H. Delignification of lgnocellulosic materal with na alkaline liquor in the presence of a cyclic keto compound. Depositante: Canadian Industries, Ltd. US 4,012,280. Depósito: 30 de ago. 1976. Concessão: 17 mar. 1977. Disponível em <<https://patents.google.com/patent/US4012280A/em>> Acesso em nov. 2018

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Key world energy statistics. 2017. Disponível em: <http://www.enecho.meti.go.jp/statistics/total_energy/results.html> Acesso em janeiro de 2018.

KHRISTOVA, P.; BENTCHEVA, S.; KARAR, I. Soda-AQ pulp blends from kenaf and sunflower stalks. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 99-103, 1998.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H.. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 42–48, 2016.

KLEMM, D.; SCHMAUDER, H-P; HEINZE, T. Cellulose. *Biopolymers* . v. 6, p.275-319, 2002.

KUBES, G. J.; FLEMING, B. I.; MACLEOD, J. M.; BOLKER, H. I. Alkaline pulping with additives. A review. *Wood Science and Technology*, v. 14, n. 3, p. 207–228, 1980.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresource Technology*, v. 103, n. 1, p. 201–208, 2012.

KUMAR, R.; TABATABAEI, M; KARIMI, K.; HORVÁTH, I. S. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol -A review. *Biofuel Research Journal*, v. 9, n. 9, p. 347–356, 2016.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, v. 165, p. 3–8, 2014.

LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnology Advances*. V. 35, p. 466-489, 2017.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, v. 59, p. 302–325, 2014.

LOPES, V. dos S.; FISCHER, J.; PINHEIRO, T. M. A.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U. C. Biosurfactant and ethanol co-production using *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures and exploded sugarcane bagasse. v. 109, p. 305–310, 2017.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 10, n. 1–2, p. 39–48, 2002.

MADADI, M. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Electronic Journal of Biology*, v. 13, n. 2, p. 135–143, 2017.

MANDELLI, F.; BRENELLI, L.B.; ALMEIDA, R.F.; GOLDBECK, R.; WOLF, L.D.; HOFFMAMA, Z.B.; RULLER, R.; ROCHA, G.J.M.; MERCADANTE, A.Z.; SQUINA, F.M. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, v. 52, p. 770–775, 2014.

MANOCHIO, C.; ANDRADE, B.R.; RODRIGUEZ, R.P.; MORAES, B.S. Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 80, p. 743–755, 2017.

MARCELINO, P. R. F.; SILVA, V. L. da; PHILIPPINI, R. R.; ZUBEN, C. J. V.; CONTIERO, J.; SANTOS, J. C. DOS; SILVA, S. S. da. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. *Plos One*, v. 12, n. 11, p. 1–16, 2017.

MENEZES, F. F. de; RENCORET, J.; NAKANISHI, S. C.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C.; ROCHA, G. J. de M. Alkaline Pretreatment Severity Leads to Different Lignin Applications in Sugar Cane Biorefineries. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 5, n. 7, p. 5702–5712, 2017.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high- solids loadings - A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 56, p. 526-544, 2013

MORAES, A. de O.; RAMIREZ, N. I. B.; PEREIRA JR, N. Evaluation of the Fermentation Potential of Pulp Mill Residue to Produce D-Lactic Acid by Separate Hydrolysis and Fermentation Using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 180, p. 1574–1585, 2016.

MOREIRA, L R S; FILHO, E X F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis

of xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1–10, 2016.

NASCIMENTO, V. M.; NAKANISHI, S. C.; ROCHA, G. J. M.; RABELO, S. C.; PIMENTA, M. T. B.; ROSSELL, C. E. V. Effect of anthraquinone on alkaline pretreatment and enzymatic kinetics of sugarcane bagasse saccharification: Laboratory and pilot scale approach. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 4, n. 7, p. 3609–3617, 2016.

NASCIMENTO, V. M.; MANRICH, A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. de C.; ROCHA, G. J. DE M.; GIORDANO, R. de L. C.. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol*, v. 2, n. 1, p. 112–125, 2016.

NETO, A. C.; GUIMARÃES, M. J. O.C.; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. *Journal of Cleaner Production*, v. 184, p. 168–178, 2018.

NOHYNEK, G. J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical*, 2004.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, v. 54, n. 4, p. 559–568, 2008.

RAELE, R.; BOAVENTURA, J. M. G; FISCHMANN, A. A.; Sarturi, Greici. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting and Social Change*, v. 87, p. 205–223, 2014.

RAHIKAINEN, J. L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O. J.; KRUIUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 270–278, 2013.

ROCHA, G. J. M; NASCIMENTO, V. M; SILVA, V. F N. Effect of Anthraquinone on Pulping of Pretreated Sugarcane Bagasse By Steam Explosion for Application in. v. 7, n. 2, p. 48–57, 2013.

RODRIGUES, P de O; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BADOTTI, F.; GÓES-NETO, A.; BAFF, M.A. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683–2693, 2020.

ROSSBERG, C.; STEFFIEN, D.; BREMER, M.; KOENIG, S.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MONIZ, P.; HOERNICKE, M.; BERTAU, M.; FISCHER, S. Pulp properties resulting from different pretreatments of wheat straw and their influence on enzymatic hydrolysis rate. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 206–212, 2014.

RUAN, Z.; ZANOTTI, M.; WANG, X.; DUCEY, C.; LIU, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 198–205, 2012.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, ASHOK. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. *Renewable Energy*, v. 98, p. 203–215, 2016.

SMUGA-KOGUT, M.; ZGÓRSKA, K.; SZYMANOWSKA- POWAŁOWSKA, D.

Influence of the crystalline structure of cellulose on the production of ethanol from lignocellulose biomass. *International Agrophysics*, v. 30, n. 1, p. 83–88, 2016;

SUGIHARTO, Yohanes Eko Chandra; HARIMAWAN, Ardiyan; KRESNOWATI, Made Tri Penia; Ari; PURWADI, Ronny; MARIYANA, Rina; ANDRY; FITRIANA, Hana Nur; HOSEN, Hauna Fathmadinda. Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 175-179, 2016;

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

TOOR, S. S.; ROSENDAHL, L.; RUDOLF, A. Hydrothermal liquefaction of biomass: A review of subcritical water technologies. *Energy*, v. 36, p. 2328–2342, 2011.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B; MORREEL, K; RALPH, J; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VAZ, S. A renewable chemistry linked to the Brazilian biofuel production. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2014.

VERARDI, A.; BLASI, A; MOLINO, A.; ALBO, L.; CALABRÒ, VINCENZA. Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: Quantitative analysis of biomass conversion. *Fuel Processing Technology*, v. 149, p. 15–22, 2016.

VISSER, E. M.; FALKOSKI, D. L.; ALMEIDA, M. N. DE; MAITAN-ALFENAS, G. P.; GUIMARÃES, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 587–594, 2013.

WATKINS, D.; NURUDDIN, M.; HOSUR, M; TCHERBI-NARTEH, A.; JEELANI, S. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 4, n. 1, p. 26–32, 2015.

WINDEISEN, E.; WEGENER, G. Lignin as Building Unit for Polymers. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, v. 10 p. 255-265, 2012.

XAVIER, M.C.A.; CORADINI, A.L.V.; DECKMANN, A.C.; FRANCO, T.T. 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.

ZHANG, H.; YE, G.; WEI, Y.; LI, X.; ZHANG, A.; XIE, J. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. *Bioresource Technology*, v. 229, p. 96–103, 2017.

ZHANG, H.; YONG, X.; ZHOU, J.; DENG, J.; WU, Y. Biomass Vanillin-Derived Polymeric Microspheres Containing Functional Aldehyde Groups: Preparation, Characterization, and Application as Adsorbent. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 8, n. 4, p. 2753–2763, 2016.

ZHANG, W.; MA, Y.; XU, Y.; WANG, C.; CHU, F. Lignocellulosic ethanol residue-based lignin-phenol-formaldehyde resin adhesive. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 40, p. 11–18, 2013.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 367–375, 2008.

CAPÍTULO II

2-hydroxy-1,4-napthoquinone (lawsone) as a redox catalyst for the alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) as a redox catalyst for the alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

Elisa da Silva Barreto^a, Márcio César Pereira^b, Daniel Pasquini^c, Bruno Eduardo Lobo Baêta^d, Valéria Monteze Guimarães^a, Leandro Vinícius Alves Gurgel^{*d}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Applied Biotechnology to Agriculture (BIOAGRO), Federal University of Viçosa, Viçosa 36570-000, Minas Gerais, Brazil

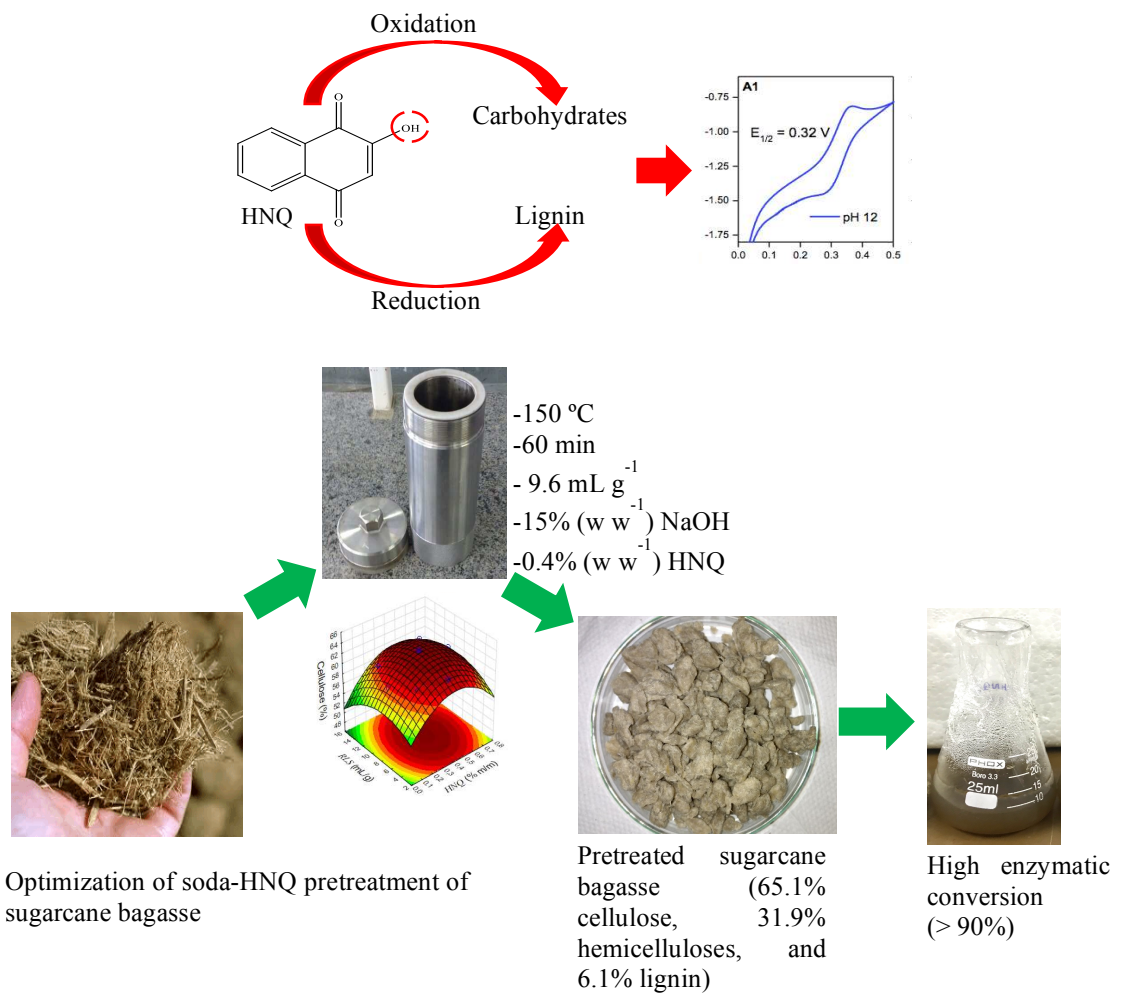
^b Institute of Science, Engineering, and Technology, Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Teófilo Otoni 39803-371, Minas Gerais, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Campus Santa Mônica, Av. João Naves de Ávila, 2121, Uberlândia 38400-902, Minas Gerais, Brazil

^d Laboratory of Technological and Environmental Chemistry, Department of Chemistry, Institute of Biological and Exact Sciences (ICEB), Federal University of Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Bauxita, Ouro Preto 35400-000, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 31 3559 1744; E-mail address: legurgel@ufop.edu.br/legurgel@yahoo.com.br (L.V.A Gurgel)

Graphical abstract



Highlights

- Lawsone was used as a new redox catalyst for the alkaline pretreatment of sugarcane bagasse.
- Lawsone presented a higher reduction potential than anthraquinone (AQ) at pH 12-13.
- Lawsone (0.4 %, w w⁻¹) presented delignification values higher than 86 % for bagasse.
- Lawsone had higher cellulose (>76 %) and hemicellulose (>86 %) preservation than AQ.
- Lawsone caused no inhibition in the enzymatic hydrolysis of pretreated bagasse.

Abstract

This study evaluated the use of a new redox catalyst (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, HNQ or lawsone) in order to contribute to the preservation of the carbohydrate fraction and to increase delignification of sugarcane bagasse (SB) subjected to a soda pretreatment, without inhibiting enzyme activity during saccharification. In addition, the effects of HNQ were compared to well-known redox catalyst anthraquinone (AQ). Two experimental designs were used for the optimization of the soda-HNQ pretreatment of SB (2^{5-1} fractional design and 2^2 central composite design). The use of HNQ promoted preservation of 76.4% cellulose, 86.1% hemicellulose and delignification of 86.1% from raw SB, showing superior performance than AQ. The conditions for SB pretreatment optimization were: liquid-to-solid ratio of 9.57 mL g^{-1} , 0.4% (ww⁻¹) HNQ, 15% (w w⁻¹) NaOH, 150°C, 60 min. Saccharification of pretreated SB-HNQ yielded higher rates of overall glucose and xylose (74.1% and 53.4%) compared to SB-AQ (64.9% and 47.7%).

Keywords: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone; lawsone; redox catalyst; alkaline pretreatment; sugarcane bagasse; second-generation ethanol

1- Introduction

The process of 2G ethanol production, in a lignocellulose biorefinery, comprises the initial step of lignocellulose biomass (LB) pretreatment, followed by the saccharification and fermentation steps. The pretreatment is necessary due to the LB recalcitrance and consists of deconstructing the lignocellulose complex, separating, and extracting the major LB constituents, i.e., polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) and lignin. Then, the polysaccharide fraction can be efficiently converted by hydrolytic enzymes into pentoses (C5) and hexoses (C6) (Robak & Balcerek, 2018). The C5 and C6 sugars can be co-fermented to ethanol by appropriate microorganisms, such as *Kluyveromyces marxianus* (Mohd Azhar et al., 2017), in mono-culture (Liu et al., 2019) or can be simultaneously fermented to ethanol in co-culture (Nosrati-Ghods et al., 2018).

The effectiveness of a pretreatment step is based on reducing the degree of crystallinity (X_c) and polymerization (DP) of polysaccharides, allowing to increase the accessibility of enzymes to cellulose (Kumari & Singh, 2018) without producing compounds that may inhibit the enzymatic hydrolysis and fermentation steps (Santos et al., 2019; Hallac & Ragauskas, 2011). The main inhibitory compounds are: (i) acetic acid and furans produced from hydrolysis and degradation of polysaccharides that interfere with the fermentation yeast metabolism and (ii) lignin fragments and lignin fragments condensed with furans, which can block the access of hydrolytic enzymes to cellulose and also promote unproductive adsorption of enzymes (Bittencourt et al., 2019; Min et al., 2014).

To this end, the alkaline biomass pretreatment has proved to be an efficient LB delignification. The pretreatments using $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH , NH_3 , NaOH have been studied, and NaOH has been indicated as one of the most efficient compounds for LB pretreatment (Agbor et al., 2011). In this pretreatment, hydroxyl anions promote the cleavage of acetyl groups from hemicelluloses and α - and β -aryl alkyl ether bonds from lignin. This leads to the degradation of lignin carbohydrate complexes (LCCs) and, consequently to the dissolution of lignin, which increases the accessibility of enzymes to cellulose (Agbor et al., 2011). However, hydroxyl anions can also promote the *peeling* effect on polysaccharide chains, leading to the dissolution of hemicelluloses and cellulose (Nascimento et al., 2016b). To overcome the *peeling* effect, the technological solutions adopted by the pulp and paper industry was the use of a redox catalyst. To this end, anthraquinone (0.1-0.5%, w w⁻¹) is used as a redox catalyst to promote oxidation and reduction cycles during alkaline delignification of LB (Kubes et al., 1980; Nascimento et

al., 2016b; Saad et al., 1988). The redox catalyst promotes the oxidation of aldehyde end groups of the polysaccharide chains to aldonic acid and the subsequent reduction of lignin. This leads to the polysaccharide preservation and also to the lignin degradation with a reduced number of condensation reactions. Some studies have shown that the oxidation of aldehyde to aldonic acid by the redox catalyst makes carbohydrate chains more stable, preventing the alkaline depolymerization (*peeling* effect). In addition, the subsequent lignin reduction by the redox catalyst accelerates and increases the delignification process selectivity (Chai et al., 2007; Lisboa et al., 2005; Nascimento et al., 2016b; Saad et al., 1988; Sjöström, 1977).

Anthraquinone and its derivatives (anthraquinone-2-sulfonate (AQS) and anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)) are examples of redox catalysts used in the cellulose and paper industry. However, their use in a lignocellulose biorefinery is unfeasible due to the inhibition caused by these compounds in enzymatic hydrolysis step (Nascimento et al., 2016b).

Therefore, this study evaluated the use of the redox catalyst 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ), also known as lawsone, which combines an oxidation/reduction potential comparable to anthraquinone HNQ (Figure 1), and is a natural molecule extracted from the *Lawsonia inermis*. The HNQ belongs to the quinone group, such as anthraquinone; however, the use of HNQ may be more advantageous since it displays higher solubility in water than anthraquinone, due the phenolic hydroxyl group at carbon 2 (C-2) of the benzoquinone ring. In addition, no study in the literature demonstrated the potential of HNQ as a redox catalyst in the alkaline pretreatment of SB. In this work, the evaluation and optimization of the soda-HNQ pretreatment of SB was performed using two experimental designs, in order to maximize delignification and preserve the polysaccharide fraction of SB. In addition, the effects of HNQ were evaluated during SB saccharification aiming to achieve maximum enzymatic conversion of hemicelluloses and cellulose into C5 and C6 sugars.

2- Material and methods

2.1- Feedstock

Sodium hydroxide, cyclohexane, and ethanol (99.5%) were purchased from Synth (Brazil). Bis(ethylenediamine) copper(II) hydroxide solution was purchased from Dinâmica (Brazil). Sulfuric acid (95-98%) was purchased from Neon (Brazil). 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (97%, HNQ) and chromatography standards cellobiose, β -

D-glucose, β -D-xylose, α -L-arabinose, acetic acid, formic acid, 2-furfuraldehyde (FF) and 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde (HMF) were purchased from Sigma-Aldrich. Commercial enzyme cocktails (Cellic CTec[®] 2 and Cellic HTec[®] 2) were kindly provided by Novozymes (Araucária, PR, Brazil). SB (2015/2016 harvest season) was collected in the Agropeu Sugar and Ethanol plant (Pompeu, MG, Brazil).

2.2- Sugarcane bagasse pretreatment, experimental design, and statistical analyses

The pretreatment of SB in an alkaline medium using the redox mediator HNQ (soda-HNQ) was evaluated and optimized. At first, a 2^{5-1} experimental screening design (resolution V) (Table 1) was used to evaluate the effect of the independent variables (*IVs*) temperature (T , °C), time (t , min), liquid-to-solid ratio (LSR , mL g⁻¹), NaOH load (% w w⁻¹), and HNQ load (% w w⁻¹) on the dependent variables (*DVs*) content of cellulose (CC), hemicelluloses (HC), and lignin (LC), removal of cellulose (CR), hemicelluloses (HR) and lignin (LR), yield (Y), enzymatic conversion of glucan to glucose (EC_G) and xylan to xylose (EC_X). Only the linear and second-order effects were analyzed in this experimental design.

Posteriorly, a 2^2 central composite design was used to optimize the most significant *IVs* from the 2^{5-1} experimental screening design. The variables fixed from the results obtained by the 2^{5-1} experimental screening design were T (150 °C), t (60 min), and NaOH load (15 % w w⁻¹). The *IVs* evaluated in the 2^2 central composite design (Table 2) were LSR and HNQ load.

The statistical analyses were made with a confidence level of 95 % using the Statistica[®] 10.0 software (StatSoft Inc.). The optimization of the soda-HNQ pretreatment of SB by the 2^2 central composite design was made using the response surface methodology (RSM). A response surface was built for each *DV* using Eq. (1), as follows:

$$DV = b_0 + b_1(HNQ) + b_2(LSR) + b_{11}(HNQ)^2 + b_{22}(LSR)^2 + b_{12}(HNQ \times LSR) \quad (1)$$

where b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} , and b_{12} are regression coefficients of the model.

The desirability tool was used to predict the optimum value of each *IV* (HNQ load and LSR) for the simultaneous optimization of the responses. The desirability tool works with scores, which indicate a very undesirable (0) and a very desirable (1) value for the responses, under simultaneous optimization. The responses simultaneously optimized

were *CC*, *HC*, and *LR*. The score attributed to these responses was 1 (very desirable). The desirable conditions (DC) predicted by the Statistica[®] software were experimentally validated. The same condition was used for anthraquinone (0.493 %, w w⁻¹), where the molar mass was equaled to lawsone (0.4 %, w w⁻¹).

The pretreatment of SB was performed in a tubular reactor vessel (475 mL, 190 mm of height × 65 mm ID × 76 mm OD) made of 316 L stainless steel with a sealing PTFE (Poly(tetrafluoroethylene)) O-ring. The reactor vessel was loaded with 30 g of SB (dry weight), different volumes of distilled water, and different concentrations of NaOH and HNQ. The reactor vessel was heated in a 25 L thermostatic bath (Model MA-159, Marconi, Brazil) containing glycerol as heating fluid at a predefined temperature and time, according to the experimental designs presented in Tables 1 and 2. At the end of pretreatment time, the reaction was stopped by quenching the reactor vessel in an ice-water bath. The mixture was defibered in a blunt-bladed blender at 2,800 rpm for 1 min, filtered (200-mesh, 0.074 mm screen) and washed with an excess of tap water until neutral pH was reached. The cellulosic pulp was stored at -20 °C in a freezer.

The removal of cellulose, hemicelluloses, and lignin from SB pretreatment was calculated using Eq. (2), as follows:

$$XR / \% = \left\{ \frac{X_{SB} - [X_{pulp} (Y/100)]}{X_{SB}} \right\} \times 100 \quad (2)$$

where *XR* (%) is the removal of the component of interest (*X* = *C* for cellulose, *X* = *H* for hemicelluloses, *X* = *L* for lignin) in the pretreated material, *X*_{SB} (%) is the content of the component of interest in SB and *Y* (%) is the yield (residual weight of pretreated material).

The *H*-factor was calculated using Eq. (3), as follows:

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (3)$$

where *t* is the time (min), and *T* is the temperature (kelvin degrees) (Vroom, 1957).

2.3-Analytical methods for characterization of solid and liquid fractions

Solid fractions were characterized by the standard methods of Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) and Laboratory Analytical Procedures (LAP) of National Renewable Energy Laboratory (NREL) for determination of the content of extractives (TAPPI T204 om-07, “Solvent Extractives of Wood and Pulp”, cyclohexane was used benzene), ash (TAPPI T211 om-02, “Ash in wood, pulp,

paper, and paperboard”), acid-insoluble lignin (*ISL*, NREL LAP-004, “Determination of Acid-insoluble Lignin Biomass”), and acid-soluble lignin (*ASL*) (Golschmidt, 1971).

A high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Model 1260 Infinity II, Agilent Technologies) equipped with an Aminex[®] column (HPX 87H, 300 × 7.8 mm, Bio-Rad) and a refraction index detector was used for quantification of sugars (cellobiose, glucose, xylose, and arabinose), and an ultraviolet-visible (UV-Vis) detector was used for quantification of organic acids (210 nm) and furans (274 nm). The eluent was an aqueous 0.005 mol L⁻¹ sulfuric acid solution pumped in isocratic mode at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The column temperature was 55 °C (Bittencourt et al., 2019). The cellulose and hemicelluloses contents were determined by conversion of sugars, sugar degradation products and organic acids according to coefficients described by Gurgel et al. (2014).

2.4- Degree of polymerization

The degree of polymerization (*DP*) of the cellulose in the pretreated material was determined by using the standard methods TAPPI T230 os-76 and SCAN-C 15:62 (Scandinavian Pulp, Paper, and Board Testing Committee). The value of *DP* was determined by measuring the intrinsic viscosity $[\eta]$ of the solvent (bis(ethylenediamine) copper(II) hydroxide in distilled water, 1:1, v v⁻¹) and cellulose solutions (250 mg in 50 mL of solvent) in an Ostwald viscosimeter at 25 °C.

The value of $[\eta]$ was determined from Eq. (4), as follows (Solomon & Ciută, 1962):

$$[\eta] = \frac{\sqrt{2}}{C} \sqrt{(n_{sp} - \ln n_{rel})} \quad (4)$$

where n_{sp} is the specific viscosity (n_{rel}^{-1}), n_{rel} is the relative viscosity, and C is the cellulose solution concentration (grams per 100 mL).

The value of the *DP* of cellulose in the pretreated material was calculated using Eq. (5), as follows:

$$DP = 0.905 \sqrt[0.75]{[\eta]} \quad (5)$$

2.5- Cyclic voltammetry

The electrochemical measurements of HNQ or AQ solutions prepared at pH values of 11, 12, 13, and 14 were carried out with a potentiostat (Model Autolab PGSTAT128N, Metrohm) using a standard three-electrode cell with Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹ KCl) reference electrode and platinum (Pt) wires as counter and working electrode at

a scan rate of 5 mV s^{-1} (Bailey & Ritchie, 1985). An aqueous 0.5 mol L^{-1} NaOH solution was used as the electrolyte. Eq. (6) was used for the conversion of the obtained potential vs. Ag/AgCl to RHE (reversible hydrogen electrode).

$$E_{(\text{RHE})} = E_{(\text{Ag/AgCl})} + 0.059 \text{ pH} + E^0_{(\text{Ag/AgCl})} \quad (6)$$

where $E^0_{(\text{Ag/AgCl})}$ (3.0 mol L^{-1} KCl) is 0.197 at $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.6- Enzymatic hydrolysis

Samples of 1.0 g (dry weight) of the solid fractions (raw SB or pretreated SB) were added to 25 mL Erlenmeyer flasks with 10 mL of a solution containing 0.05 mol L^{-1} citrate buffer ($\text{pH } 4.8$), 0.2% (w v^{-1}), sodium azide and a mixture of enzymatic cocktails Cellic CTec[®] 2: Cellic HTec[®] 2 (85% : 15% , v v^{-1} ; 10 FPU g^{-1}), with activity of $264.29 \text{ FPU mL}^{-1}$ and β -glucosidase activity of 52.72 IU mL^{-1} . A control experiment was carried out without the addition of enzymatic cocktail. The flasks were stirred at 150 rpm and $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in a shaker incubator (Model MA-830, Marconi, Brazil) for 72 h . At the end of hydrolysis, the reaction was stopped by quenching the flasks in a water bath at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min and the liquid phase was separated from the solid phase by centrifugation at $3,000\times\text{g}$ for 10 min (Bittencourt et al., 2019). The concentration of cellobiose, glucose, xylose, and arabinose in the liquid phase was determined by HPLC (Section 2.3).

The values of EC_G and EC_X were calculated using Eqs. (7) and (8), respectively.

$$EG_G / \% = \left[\frac{w_{\text{Glucose}} f_{h,G}}{w_{\text{sample}} (Y_G / 100)} \right] \times 100 \quad (7)$$

$$EG_X / \% = \left[\frac{w_{\text{Xylose}} f_{h,X}}{w_{\text{sample}} (Y_X / 100)} \right] \times 100 \quad (8)$$

where w_{Glucose} and w_{Xylose} (g) are the weights of glucose and xylose released in the enzymatic hydrolysis of glucan (cellulose) and xylan (hemicelluloses), w_{sample} (g) is the weight of solid fraction, $f_{h,G}$ (0.9) and $f_{h,X}$ (0.88) are the conversion factors of glucose to glucan and xylose to xylan, Y_G , and Y_X (%) are the contents of glucan and xylan in the sample subjected to enzymatic hydrolysis, respectively.

3- Results and discussion

3.1- Characterization of the raw sugarcane bagasse

The raw SB contained 48.7 % cellulose, 21.1 % hemicelluloses, 24.8 % lignin, 2.3 % extractives, and 0.4 % ash. These values are in agreement with those obtained from average chemical composition of SB from different sugarcane varieties cultivated in Brazil (Rocha et al., 2015), with small variations, that are mainly related to harvest season, maturation stage, sugarcane variety, soil conditions, and climate as well as differences in the methodologies employed for SB characterization.

3.2- Experimental screening design for evaluation of soda-HNQ pretreatment of raw sugarcane bagasse

The use of a redox catalyst as a transferring electrons source can ensure the reduction of lignin by the oxidation of anomeric carbons of reducing end groups of cellulose and hemicellulose chains (Kubes et al., 1980). This increases the delignification rate preventing both lignin recombination and depolymerization of cellulose and hemicelluloses (Menezes et al., 2017).

The new redox catalysts must be molecules that exhibit characteristics such as high redox potential, solubility, and stability in alkaline medium at high temperatures. In addition, the catalyst cannot inhibit the action of hydrolytic enzymes on the substrate during the saccharification step.

In this study, the effect of redox catalyst HNQ on the preservation of cellulose and hemicelluloses, as well as the removal of lignin from SB, was evaluated. A 2^{5-1} experimental screening design was used to evaluate the effect of five independent variables (*IVs*) (*T*, *t*, *LSR*, NaOH load, and HNQ load) on the responses yield (*Y*), cellulose composition (*CC*), hemicellulose composition (*HC*), lignin composition (*LC*), cellulose removal (*CR*), hemicellulose removal (*HR*), lignin removal (*LR*), enzymatic conversion to glucose (*EC_G*), and enzymatic conversion to xylose (*EC_X*). The matrix of experiments for the 2^{5-1} experimental screening design and the results for evaluated responses are shown in Table 1. The statistical significance of each *IV* on *CC*, *HC*, *LC*, *CR*, *HR*, and *LR* was evaluated by Pareto charts of standardized effects (Supplementary, Figures S1 and S2). The NaOH load had the most statistically significant effect on the *CC* (8.526), *CR* (8.212), *HR* (14.399), *LC* (-12.288), *LR* (19.842) and *HC* (-4.591) (Figures S1 and S2). The use of NaOH load at the higher level (25 g NaOH 100 g SB⁻¹) promoted higher lignin

removal (*LR*) of 78.4-89.4 % (experiments 5, 7, 11, 12, 14, 17, 18, and 19, Table 1). At these pretreatment conditions, the hydroxyl anions from NaOH were probably the main responsible for the removal of lignin by the cleavage of α - and β -aryl-alkyl-ether bonds. The use of higher NaOH load led to *HR* values in the range of 19.1-54.8 % (experiments 5, 7, 11, 12, 14, 17, 18, and 19, Table 1) and *CR* values in the range of 26.4-44.0 %. This result shows that the use of NaOH load at the higher level led to efficient removal lignin but also led to undesirable polysaccharides removal (cellulose and hemicelluloses). Lignin removal in the alkaline medium can occur by the cleavage of ester bonds between hydroxyl groups of hemicelluloses and ferulic acids of lignin (Sun & Cheng, 2002), that may also lead to an undesirable hemicellulose removal. Nascimento et al. (2016a) performed a soda pretreatment (121 °C, 60 min, *LSR* of 10 mL g⁻¹) of raw SB using a 40% (w w⁻¹) NaOH load and reported *HR* value of 55 %, of which 15 % of hemicellulose was removed in the form of lignin-carbohydrate complexes (LCCs).

The effect of temperature (*T*) was significant on hemicellulose content (*HC* - 4.967) and for cellulose and hemicellulose removal (*CR* 6.802, and *HR* 8.869) (Figure S1 and S2). According to Sjöström (1977), the combination between strong alkaline medium and high temperatures causes an initial dissolution of carbohydrates from polysaccharide chains and β -elimination of reducing end groups (*peeling* effect) (Lisboa et al., 2005). However, the random alkaline cleavage of $\beta(1\rightarrow4)$ linkages in polysaccharide chains also contribute significantly to the decrease of *DP*. Since the chains of hemicelluloses have a low degree of polymerization (*DP*) compared to cellulose, hemicelluloses are more susceptible to depolymerization and solubilization in the alkaline medium (Lisboa et al., 2005). Therefore, the use of a redox catalyst, such as HNQ, should prevent the *peeling* effect in polysaccharide chains.

In this work the HNQ load was significant for second-order effects, such as the interaction of HNQ load and liquid-solid ratio (*LSR*), showing positive (5.658) and negative (-5.288) effects on the *HC* and *HR* responses, respectively. This results indicates that higher level of HNQ load combined with liquid-solid ratio is desirable for the preservation of hemicelluloses fraction.

The enzymatic conversions of cellulose to glucose (*EC_G*) and xylan to xylose (*EC_X*), in the presence of different HNQ loads, was higher than 90 % and 52 %, respectively (experiments 1(CP), 2(CP), 3(CP), 7, 11, 14, 17, 18, and 19) (Table 1). This result suggests that the use of HNQ in the soda pretreatment of raw SB dit not inhibit the hydrolytic enzymes during saccharification. On the other hand, Nascimento et al. (2016b), related negative effect of AQ on enzymatic hydrolysis of SB samples pretreated

with soda-AQ (170 °C, 30 min, 15% (w w⁻¹) NaOH, 0.15 % (w w⁻¹) AQ), which promoted reduction of 27.4 % on EC_G compared to soda pretreatment without AQ .

Considering that desirable results were obtained in the experimental conditions at the center point (150 °C, 60 min, 15 % (w w⁻¹) NaOH, 0.2 % (w w⁻¹) HNQ, LSR of 9 mL g⁻¹) in terms of CR , HR , LR , EC_G , and EC_X (Table 1), the values of the variables T (150 °C), t (60 min), and NaOH load (15 %, w w⁻¹) were fixed for subsequent optimization of the soda-HNQ pretreatment of raw SB. The HNQ (Figure 1) (octanol-water partition coefficient (K_w), $\log K_w$ of 1.38) is more soluble in water than AQ ($\log K_w$ of 3.39), which allows a higher diffusion rate of HNQ into the lignocellulose than AQ. Since diffusion of the redox catalyst from cell wall (lumen) to intercell scale (primary cell wall and middle lamella) is the main limiting factor for obtaining of high delignification rates and carbohydrate preservation, the redox catalyst load has to be sufficiently high to promote the desirable effect (Nascimento et al., 2016b). The results obtained in the experimental screening design may suggest that the HNQ load used was not sufficiently high to promote a desirable effect on soda pretreatment of raw SB, since HNQ load was estimated based on AQ load (0.15%, w w⁻¹) often used in the soda pulping (Nascimento et al., 2016b; Saad et al., 1988). Therefore, an optimization of the HNQ load was required.

Figure 1. (a) Chemical structures of anthraquinone (AQ) and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) and (b) redox reaction of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Bailey & Ritchie, 1985).

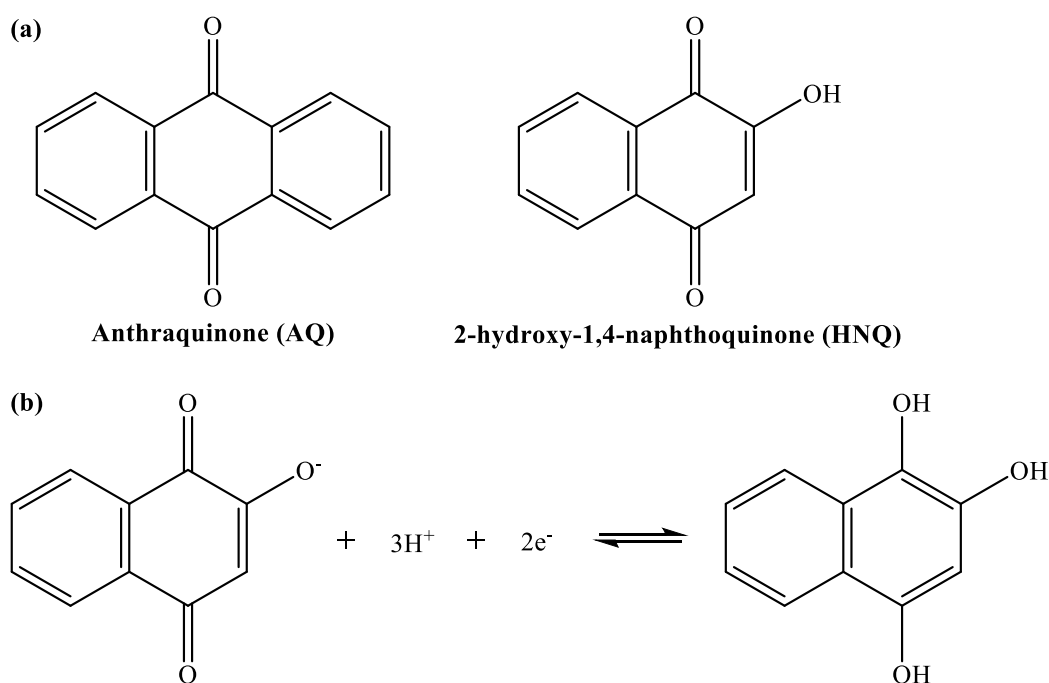


Table 1. Matrix of experiments for 2^{5-1} experimental screening design in terms of uncoded levels and the results obtained for the responses evaluated.

Assay	Independent variable (uncoded level)					Response evaluated (dependent variable)										<i>H</i> -factor
	<i>T</i> / (°C)	<i>t</i> / (min)	HNQ load / (% w w ⁻¹)	<i>LSR</i> / (mL g ⁻¹)	NaOH load / (% w w ⁻¹)	<i>Y</i> / %	<i>CC</i> / %	<i>HC</i> / %	<i>LC</i> / %	<i>CR</i> / %	<i>HR</i> / %	<i>LR</i> / %	<i>EC_G</i> / %	<i>EC_X</i> / %		
1 (CP)	150	60	0.2	9	15	51.9	66.1±1.1	25.3±0.6	10.0±1.3	29.6±1.1	37.6±1.5	79.0±2.7	92.5±1.5	90.1±4.7	165	
2 (CP)	150	60	0.2	9	15	53.6	62.2±1.5	27.7±1.0	9.4±0.6	31.6±1.7	29.5±2.6	79.6±1.2	95.7±0.1	72.3±4.7	165	
3 (CP)	150	60	0.2	9	15	53.6	59.7±1.6	27.5±0.5	12.8±1.0	34.3±1.8	30.4±1.2	72.4±3.2	100.6±0.4	73.8±0.6	165	
4	120	90	0.3	12	5	72.1	50.6±1.1	30.1±1.2	18.8±0.8	25.1±1.6	ND	45.4±2.2	38.5±2.9	28.5±1.6	13	
5	120	30	0.1	6	25	52.7	64.6±0.6	25.0±3.4	8.9±0.4	30.1±0.7	37.7±1.0	81.1±0.8	73.5±0.9	16.8±0.3	4	
6	120	90	0.1	6	5	75.4	50.9±0.9	30.0±0.7	19.3±0.6	21.1±1.3	ND	41.4±1.7	36.6±0.8	30.8±0.3	13	
7	180	30	0.1	12	25	44.3	64.2±1.4	24.3±1.0	10.1±0.5	41.5±1.3	49.1±2.0	81.9±0.7	97.4±2.3	69.9±2.84	1025	
8	180	30	0.3	12	5	64.5	49.3±1.7	31.6±0.8	17.8±0.4	34.7±2.3	13.8±3.2	53.6±1.2	45.2±0.2	29.0±0.23	1025	
9	180	90	0.1	12	5	64.7	57.2±2.0	21.7±1.4	22.9±0.4	24.1±2.6	33.5±4.2	40.2±1.1	64.2±0.0	61.9±0.1	3076	
10	120	30	0.3	6	5	82.6	52.5±1.6	29.3±1.6	19.2±0.5	11.0±2.8	ND	36.2±1.6	32.4±1.2	24.1±0.3	4	
11	180	90	0.1	6	25	41.1	66.4±2.6	27.6±0.1	6.4±2.0	44.0±1.7	50.2±0.1	89.4±3.3	92.4±0.3	52.4±0.9	3076	
12	120	30	0.3	12	25	59.4	60.3±1.7	28.8±1.5	10.6±0.5	26.4±2.1	19.1±4.1	74.6±1.3	85.5±1.6	54.3±2.6	4	
13	180	30	0.1	6	5	75.2	50.2±0.3	28.1±0.4	19.8±0.9	22.4±0.4	ND	39.9±2.7	14.4±0.4	13.0±0.8	1025	
14	180	90	0.3	12	25	46.9	69.6±2.7	21.3±1.2	7.5±2.2	33.0±2.6	52.5±3.4	85.9±4.2	98.4±2.2	83.1±3.7	3076	
15	180	90	0.3	6	5	57.8	57.4±2.0	20.1±1.1	22.1±0.6	31.9±2.4	45.1±1.7	48.5±1.4	64.2±0.5	59.9±0.5	3076	
16	120	30	0.1	12	5	76.7	49.4±1.1	28.8±0.7	21.6±2.2	22.2±1.7	ND	33.0±6.7	42.0±1.1	28.2±0.3	4	
17	120	90	0.3	6	25	46.6	69.7±0.5	22.2±0.3	9.6±1.4	33.3±0.5	51.0±3.4	81.9±2.7	98.9±0.6	70.32±0.5	3076	
18	180	30	0.3	6	25	48.7	68.3±1.6	19.5±1.7	9.1±3.5	31.7±1.6	54.8±4.0	82.1±6.8	93.6±5.8	69.9±2.3	1025	
19	120	90	0.1	12	25	53.0	64.4±0.9	26.5±0.5	10.1±0.5	29.9±0.9	33.7±1.4	78.4±1.0	99.3±0.4	69.4±1.1	13	

CP: center point; *T*: temperature; *t*: time; *LSR*: liquid-to-solid ratio; HNQ: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone; *Y*: Yield; *EC*: enzymatic conversion; *C*: cellulose; *H*: hemicelluloses; *L*: lignin; *XC*: component content (*X* = *C*, *H* or *L*); *XR*: component removal (*X* = *C*, *H* or *L*);

1 3.3- Optimization of soda-HNQ pretreatment of raw sugarcane bagasse by surface 2 response methodology

3 A 2^2 central composite design was created for optimization of soda-HNQ
4 pretreatment of raw SB and evaluation of the effect of HNQ on delignification as well as
5 the preservation of the polysaccharide fraction of raw SB. In this experimental design,
6 the higher level of HNQ load was increased to $0.68 \text{ g}_{\text{HNQ}} 100 \text{ g}_{\text{SB}}^{-1}$ (0.68%, w w⁻¹) in
7 comparison to 2^{5-1} experimental design ($0.3 \text{ g}_{\text{HNQ}} 100 \text{ g}_{\text{SB}}^{-1}$) (Section 0). The matrix of
8 experiments and the results for the evaluated responses (Table 2) showed that lower *LC*
9 (< 7%) and higher *LR* (> 85%) values were obtained at the center point (0.4% (w w⁻¹)
10 HNQ load, *LSR* of 9 mL g^{-1}) as well as lower *CR* (< 29%) and *HR* (< 22%) values. The
11 *CR* and *HR* values of 15.7% and 47.7%, respectively, were determined from soda-AQ
12 pretreatment of raw SB at 170 °C, 30 min, 15% (w w⁻¹) NaOH load and 0.15% (w w⁻¹)
13 AQ load (Nascimento et al., 2016b). Therefore, as shown in the present work, the redox
14 catalyst HNQ acted in preventing cellulose removal and the effect of HNQ was more
15 pronounced in the hemicelluloses fraction preservation, compared to catalyst AQ
16 (Nascimento et al., 2016b). Also, HNQ was more efficient than AQ in promoting
17 delignification of raw SB, as indicated by the *LR* values, which were 85.7 % for HNQ
18 and 80.9% for AQ (Nascimento et al., 2016b). The preservation of hemicelluloses fraction
19 is fundamental in pretreatments based on the lignin removal, since the polysaccharide
20 fraction (cellulose and hemicelluloses) can be further converted into monosaccharides
21 (C5 and C6) by enzymatic hydrolysis. It has been shown that C6 and C5 sugars can be
22 simultaneously fermented to ethanol using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and
23 *Pichia stipites* (Nosrati-Ghods et al., 2018).

24 Pareto charts of standardized effects (Figure S3) were used to evaluate the
25 significance of *IVs* HNQ load and liquid-solid rate (*LSR*) on the soda-HNQ pretreatment
26 of raw SB. The HNQ load had a statistically significant effect on contents of cellulose
27 (*CC* 4.417) and lignin (*LC* -8.227), suggesting the higher level of HNQ favored both the
28 cellulose preservation and lignin removal. Although the liquid-solid ratio did not show
29 significant linear effect on *CC* (-2.159), *HC* (-0.266), and *LC* (0.942), the higher *LSR*
30 promotes the dilution of the HNQ on reaction medium. The low concentration of HNQ
31 reduces its diffusion dilution into lignocellulose, and consequently, reduces its decrease
32 delignification and preservation of cellulose and hemicelluloses.

Table 2. Matrix of experiments for 2^2 central composite design in terms of uncoded levels and the results obtained for the responses evaluated.

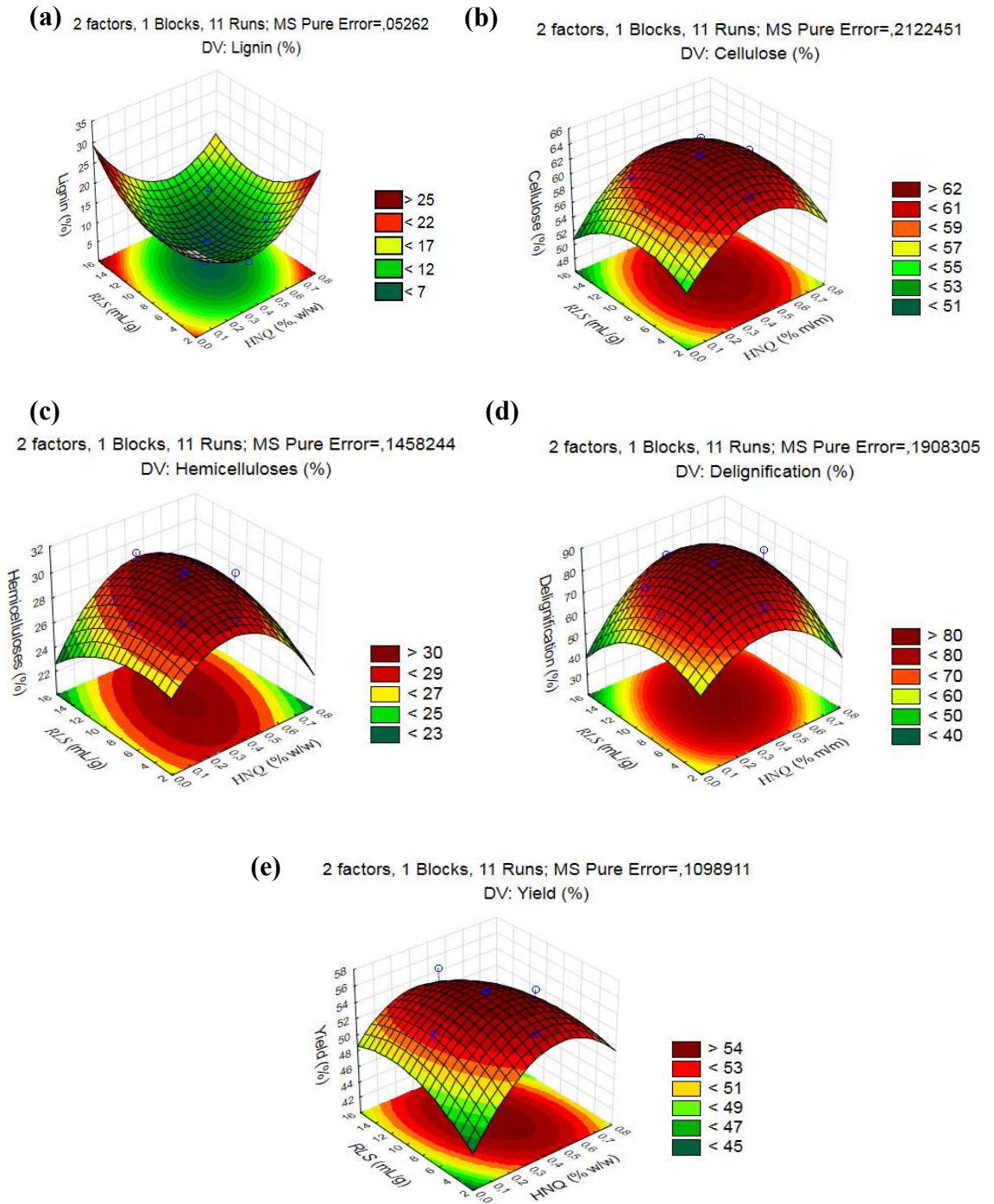
Assay	Independent variable (uncoded level)		Response evaluated (dependent variable)									DP_v^a	H- factor
	HNQ load / (%, w w ⁻¹)	LSR / (mL g ⁻¹)	Y / %	CC / %	HC / %	LC / %	CR / %	HR / %	LR / %	EC _G / %	EC _X / %		
1 (CP)	0.4	9	56.0	63.1 ± 0.3	30.2 ± 0.7	6.4 ± 1.4	27.5 ± 0.4	20.0 ± 1.8	85.7 ± 3.1	91.3 ± 0.1	85.35 ± 4.1	1674	165
2 (CP)	0.4	9	55.5	62.6 ± 1.2	29.8 ± 0.5	6.6 ± 1.2	28.7 ± 1.4	21.8 ± 1.7	85.3 ± 4.7	97.6 ± 0.1	80.11 ± 1.3	1717	
3 (CP)	0.4	9	56.1	63.5 ± 0.5	30.6 ± 0.3	6.1 ± 0.5	26.8 ± 0.5	18.9 ± 0.8	86.1 ± 1.2	96.5 ± 1.5	83.37 ± 0.1	1545	
4	0.2	13	52.3	59.7 ± 0.5	27.7 ± 1.4	13.0 ± 1.4	35.9 ± 0.5	31.4 ± 3.5	72.7 ± 3.0	97.7 ± 0.8	90.98 ± 0.0	1515	
5	0.6	5	53.7	60.8 ± 0.1	27.7 ± 0.3	14.3 ± 0.3	32.9 ± 0.1	29.5 ± 0.9	69.1 ± 0.7	79.3 ± 0.2	71.84 ± 1.5	1788	
6	0.4	3.34	54.4	61.6 ± 0.0	29.1 ± 0.4	9.3 ± 1.0	31.1 ± 0.0	25.02 ± 1.1	79.7 ± 2.1	67.1 ± 0.1	59.91 ± 0.2	1668	
7	0.6	13	51.2	61.3 ± 0.5	28.0 ± 1.1	12.0 ± 0.4	35.6 ± 0.5	32.2 ± 2.6	75.1 ± 0.8	81.1 ± 6.9	75.35 ± 1.2	1488	
8	0.68	9	54.0	61.4 ± 0.9	28.9 ± 0.3	7.6 ± 0.1	32.0 ± 0.9	26.2 ± 0.9	83.5 ± 0.1	96.0 ± 0.5	82.43 ± 2.4	1407	
9	0.12	9	53.4	58.8 ± 0.1	28.0 ± 0.1	13.0 ± 0.8	35.4 ± 0.2	29.1 ± 0.2	71.9 ± 1.7	94.7 ± 5.3	75.50 ± 0.4	1582	
10	0.4	14.66	55.7	59.8 ± 1.5	29.9 ± 0.2	9.9 ± 1.5	31.7 ± 1.7	21.2 ± 0.4	77.7 ± 3.4	98.1 ± 0.3	78.65 ± 0.7	1651	
11	0.2	5	52.3	60.3 ± 1.1	29.4 ± 0.1	11.0 ± 1.8	35.2 ± 1.1	27.3 ± 0.2	76.7 ± 3.8	96.9 ± 0.2	83.90 ± 0.4	1627	
WHNQ	0	9	51.0	66.9 ± 0.5	27.3 ± 0.4	8.0 ± 0.6	30.0 ± 0.5	34.1 ± 0.6	83.5 ± 1.0	-	-		

^a Average of five measures. CP: center point; LSR: liquid-to-solid ratio; HNQ: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone; Y: Yield; EC: enzymatic conversion; C: cellulose; H: hemicelluloses; L: lignin; XC: component content ($X = C, H$ or L); XR: component removal ($X = C, H$ or L); WHNQ: soda-pretreatment without HNQ addition.

The effects of *LSR* and HNQ load on *CC*, *HC*, *LC*, and *LR* were evaluated by response surface (Figure 2a-d). The regression coefficients for the quadratic models generated are presented in Table S1. The highest R^2 value (0.9346) obtained from second-order polynomial equation was that for the response *CC*, showing that this model can explain ~93 % of the *CC* variability with an error of ~7 %. The variables *HC*, *LC*, and *LR* presented R^2 values of 0.7042, 0.6968, and 0.7050, respectively. This model which means that these models can explain ~70.4 %, ~69.7 %, and ~70.5 % of the *HC*, *LC*, and *LR* variabilities with errors of ~29.6 %, ~30.3 %, and ~29.5 %, respectively. Considering the complexity of the system evaluated, these results can be considered very satisfactory. The responses surfaces (Figures 2a-d) show that the higher preservation of the polysaccharide fraction, as well as the higher delignification and lower lignin content, were observed at 0.4 % (w w⁻¹) HNQ load and *LSR* of 9 mL g⁻¹. These results indicated that reduced HNQ load resulted in higher preservation of the polysaccharides and removal of lignin in the pretreated SB. This is interesting, since additive cost is of extreme importance on catalyzed pretreatments. The effectiveness of a pretreatment not only depends on its efficiency of biomass deconstruction but also on the transport phenomena in mass transfer and heat, reactor design, presence of additives, type of chemicals used and processing conditions (Nascimento et al., 2016b). Therefore, the optimization of the HNQ load is critical for transferring the technology from a bench-scale to a pilot-scale.

The values of enzymatic conversion of cellulose to glucose (EC_G) and xylan to xylose (EC_X) in the optimization of soda-HNQ pretreatment of raw SB (Table 2) were higher compared to the values obtained in the 2⁵⁻¹ experimental screening design (Table 1). Different experimental conditions (Table 2) led to EC_G and EC_X higher than 90 % and 72 %, respectively. The average EC_G and EC_X at the center point (0.4 % (w w⁻¹) HNQ load, *LSR* of 9 mL g⁻¹) were 95.1 % and 82.9 %, respectively, showing the efficiency of the pretreatment soda-HNQ proposed in this study. The overall yields of glucose yield (OGY) and overall xylose yield (OXY) were 68.79 % and 74.69 %, respectively.

Figure 2. Response surfaces generated from the quadratic model for (a) lignin content (*LC*), (b) cellulose content (*CC*), (c) hemicelluloses content (*HC*) and (d) lignin removal (*LR*) as function of HNQ load ($w w^{-1}$) and *LSR* ($mL g^{-1}$).



3.4- Desirability tool and validation of the statistical model

The desirability tool was used to optimize the response variables *CC*, *HC*, and *LR*, simultaneously. This tool can predict the values of the *IVs* HNQ load and *LSR* as a function of the desirability level of each *DV* chosen. The desirability level of *CC*, *HC* and *LR* was set to 1 (very desirable) since the preservation of the polysaccharide fraction with the concomitant removal of lignin fraction is the main purpose of pretreatment for 2G ethanol production. The desirability tool predicted that a soda pretreatment of raw SB carried out with 0.4 % (w w⁻¹) HNQ load and 9.57 mL g⁻¹ (150 °C, 60 min, 15 % (w w⁻¹) NaOH load) would result in 63.02 % *CC*, 30.18 % *HC*, and 85.58 % *LR*. The experimental validation of this pretreatment condition was carried out and the results are shown in Table 3. The percentage relative error between predicted and observed values for *CC*, *HC*, and *LR* was 3.2 %, 5.4 %, and 0.6 %. Therefore, considering a confidence level of 95 % the generated empirical models can be considered as robust models to predict the responses *CC*, *HC*, and *LR*.

Table 3. Validation of pretreatment conditions predicted by desirability tool and comparison of the performance of the redox catalysts HNQ and AQ for soda pretreatment of raw SB.

R _{Cat}	<i>Y</i> / (%)	<i>CC</i> / (%)	<i>HC</i> / (%)	<i>LC</i> / (%)	<i>CR</i> / (%)	<i>HR</i> / (%)	<i>LR</i> / (%)	<i>EC_G</i> / (%)	<i>EC_X</i> / (%)	<i>DP_v</i>
HNQ ^a	57.1 ±0.8	65.1±0.5	31.9±0.4	6.1±0.4	23.6±1.6	13.8±2.3	86.1±0.6	96.9±0.7	62.6±0.4	2016 ±17
AQ ^b	56.3 ±1.6	60.2±1.9	29.6±0.7	10.2±0.2	30.4±0.8	21.1±4.0	76.8±1.1	93.2±5.7	60.5±0.7	1723 ±22

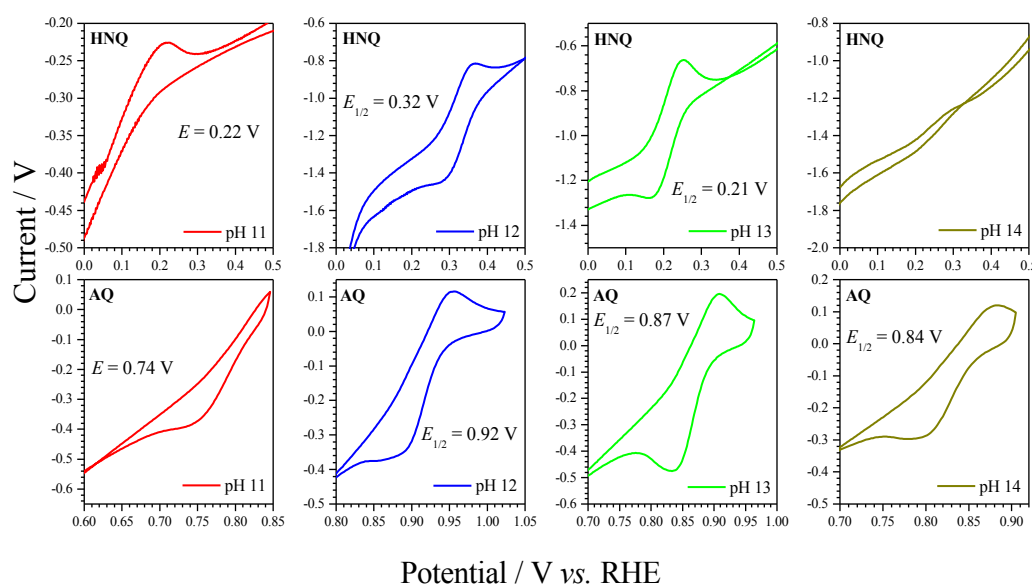
R_{Cat}: redox catalyst; ^a0.4 % (w w⁻¹); ^b0.493 % (w w⁻¹).

3.5- Cyclic voltammetry of the redox catalysts

The redox behavior of HNQ and AQ at different pH values was investigated by cyclic voltammetry (Figure 3). The HNQ voltammogram at pH 11 showed an irreversible oxidation peak at potential (*E*) 0.22 V vs. RHE, corresponding to the oxidation of HNQ to the corresponding anion radical (HNQ^{•-}). On the other hand, AQ only showed an irreversible reduction peak at 0.74 V vs. RHE at pH 11. At pH 12 and 13, both HNQ and AQ can be reversibly oxidized and reduced. At pH 14, the lack of cathodic and anodic peaks in the voltammogram suggest the decomposition of HNQ. The AQ voltammogram at pH 14 showed asymmetric oxidation/reduction peaks due to its partial decomposition. Thus, the redox behavior of HNQ and AQ are pH-dependent in the range of 11-14 but a Nernstian relationship cannot be observed. The HNQ has lower oxidation potential than

AQ, which suggests that HNQ is thermodynamically more easily reduced than AQ. This result agrees well with the higher SB delignification efficiency of HNQ compared to AQ. To reduce lignin during the soda pretreatment of SB, initially the AQ needs to be reduced to anthrahydroquinone (AHQ), which is the soluble form (Chai et al., 2007). However, due to the lower reduction potential of AQ, the rate of AHQ formation should decrease and consequently could affect lignin solubilization during the soda pretreatment. In addition, the self-proton transfer may further increase the HNQ reduction rates. These reactions are due to the presence of the hydroxyl group at carbon 2 (C-2) (Figure 1b) and those formed after electrochemical reduction of HNQ at C-1 and C-4 to form hydroquinone. The formed anion is sometimes consumed by transferring protons from another HNQ molecule, decreasing oxidation reactions and increasing the HNQ reduction (Hijji et al., 2012). Thus, it was identified that at pH 12 (pH of black liquor in the optimized condition), the HNQ molecule plays a key role in the preservation of cellulose and hemicelluloses fraction as well as lignin solubilization.

Figure 3. Cyclic voltammograms for 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) and anthraquinone (AQ) at different pH values. Electrolyte: 0.5 mol L⁻¹ NaOH; scan rate: 5 mV s⁻¹.



3.6- Effect of redox catalysts HNQ and AQ on chemical composition, enzymatic hydrolysis and degree of polymerization of pretreated SB

The efficiency of the redox catalysts HNQ (0.4% (w w⁻¹)) and AQ (0.493% (w w⁻¹)) on the preservation of polysaccharide fraction and lignin removal during soda pretreatment of raw SB (150 °C, 60 min, 15% (w w⁻¹) NaOH load, and *LSR* of 9.57 mL g⁻¹) were evaluated and compared. For comparison purposes, an equimolar amount of the redox catalysts was tested, although an AQ amount of 0.15% (w w⁻¹) for delignification of raw SB was optimized by Saad et al. (1988). The results (Table 3) showed that the HNQ promoted lower *LC* and a higher *LR* than AQ, which indicates that HNQ catalyzed the delignification reactions in alkaline medium, increasing the lignin solubilization by 12.1%, compared to AQ. The use of the HNQ also led to higher *CC* and *HC* and lower *CR* and *HR* compared to the AQ. This result indicates that HNQ increased the preservation of polysaccharide fraction of SB by 8.1% of cellulose and 7.8% of hemicelluloses, compared to AQ. Accordingly, the *DP* value of cellulose pulp obtained from the soda pretreatment of raw SB with HNQ was 17.0% higher compared to AQ, which indicates that HNQ promoted reduction of the *peeling* effect. In addition, the use of HNQ promoted increase the conversion of cellulose to glucose (*EC_G*), xylan to xylose (*EC_X*) and overall glucose (*OGY*) and xylose (*OXY*) yield by 4.0%, 14.2%, 2.0%, and 11.9%, respectively, compared to AQ. The values of *OGY* and *OXY* from HNQ and AQ were 74.1%, 53.4%, 64.9% and 47.7%, respectively. *OXY*), which indicate that HNQ had less inhibitory effect on the activity of hydrolytic enzymes. Therefore, these results confirm the improved performance of the HNQ and show the potential of this redox catalyst for application in the soda pretreatment of lignocellulose biomass in a biorefinery.

As pointed out in Sections 3.4 and 3.5, the better performance of the redox catalyst HNQ compared to AQ can be related to (i) higher solubility in aqueous alkaline solution due to the presence of a hydroxyl group at C-2 of benzoquinone ring and (ii) lower oxidation potential. The p*K_a* of the hydroxyl group at C-2 of HNQ is 3.98 (Lamoureux et al., 2008). Therefore, at alkaline pH value of the soda pretreatment, the anionic form of HNQ predominates, which increases its solubility in the aqueous phase. In contrast, the low solubility of AQ in the cooking liquor at low temperatures may cause clogging of the pumping lines after insoluble AQ deposit as a fine powder, leading to undesirable maintenance problems in the plant (Revenga et al., 1996). (iii) HNQ is

thermodynamically more easily reduced, improving the redox cycle and delignification efficiency

Nascimento et al. (2016b) reported that the pretreatment parameters, such as temperature, heating rate, reaction time, and agitation, are the main factors affecting the diffusion rate of AQ into the lignocellulose structure. These authors observed cellulose preservation of 24.7% and 10.6 % from the soda-AQ pretreatment using reactor vessel at 170 °C with and without agitation, respectively. However, a reactor vessel with a stirring system limits the reactor size, and therefore, the amount of raw SB processed per batch, which increases the processing costs of a 2G ethanol production plant. Consequently, the use of a very soluble redox catalyst at alkaline pH, such as HNQ, ensures that even in a static reactor vessel, the redox catalyst can diffuse into the lignocellulose, reducing the *peeling* effect and increase delignification.

In addition, the presence of AQ decreased the EC_G value in the pretreated SB, leading to a reduction of 9.37 g L⁻¹ glucose in the enzymatic liquor (Table 3). A more glucose-concentrated liquor is desirable to fermentation and distillation steps in the 2G ethanol production process (Bittencourt et al., 2019; Caspeta et al., 2014; Xue et al., 2012).

Yang et al. (2016) also attributed the inhibition of cellulolytic enzymes, during the enzymatic hydrolysis, to the non-removal of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) in the pretreated wheat straw by soda-AQ. These authors observed that the EC value from soda-AQ was 16.3% lower than the kraft, although the pretreated materials had only 5% of residual lignin. The presence of LCCs additional recalcitrance of pretreated material, since LCCs display similar role to hemicelluloses as protecting the cell wall against enzyme attack (Min et al., 2014).

In addition, the EC value is strongly influenced by chemical and physical changes that occurred during the biomass pretreatment, including the decrease in the DP value. A lower DP leads to a higher number of reducing end groups in cellulose chains and a higher reactivity of cellulose chains to enzymes, improving the performance of cellulolytic enzymes during saccharification (Hallac & Ragauskas, 2011). The results obtained in this study showed that, although the pretreated SB maintained cellulose with a higher DP value and elevate hemicelluloses content (Table 3), there was efficient conversion rate ($EC_G > 96\%$ and $EC_X > 62\%$). This result indicates that use of HNQ promoted higher selectivity in lignin removal (86.1%) and an efficient disruption of lignocellulose complex without a significant loss of the cellulose (23.6%) and hemicelluloses (13.8%) fractions compared AQ (30.4% CR , 21.1% HR). In addition, more selective extraction of

lignin fraction was expected, since the redox catalyst prevents the lignin recombination (Kubes et al., 1980). However, further studies are needed to elucidate the structure of lignin obtained by the soda-HNQ pretreatment of raw SB in order to evaluate the possible production of added-value chemicals.

4- Conclusions

The optimization of the new sugarcane bagasse pretreatment with NaOH/2-hydroxy-1,4-naphthoquinone led to a good preservation of cellulose and hemicellulose and a high delignification. High enzymatic conversions of cellulose to glucose, xylan to xylose with overall glucose (76.4%) and xylose (84.6%) yields were achieved, indicating that there was no inhibition of the hydrolytic enzymes by the use of HNQ compared to anthraquinone (AQ). HNQ proved to be more efficient than AQ, with the advantage of HNQ is a natural molecule commercially available.

E-supplementary data for this work can be found in the online version of the paper.

5- Acknowledgments

The authors are grateful to Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, grant number CEX-APQ-01376-18) for funding this research. Professor Leandro V. A. Gurgel is grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 307445/2019-4) for the provision of a fellowship. This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance Code 001).

6- Electronic Supplementary Material

Figure S1: Pareto Chart with first and second order interactions for the chemical composition of pretreated bagasse. Temperature ($^{\circ}\text{C}$); time (min); HNQ ($\%$, w w^{-1}); LSR (mL g^{-1}); NaOH ($\%$, w w^{-1}).

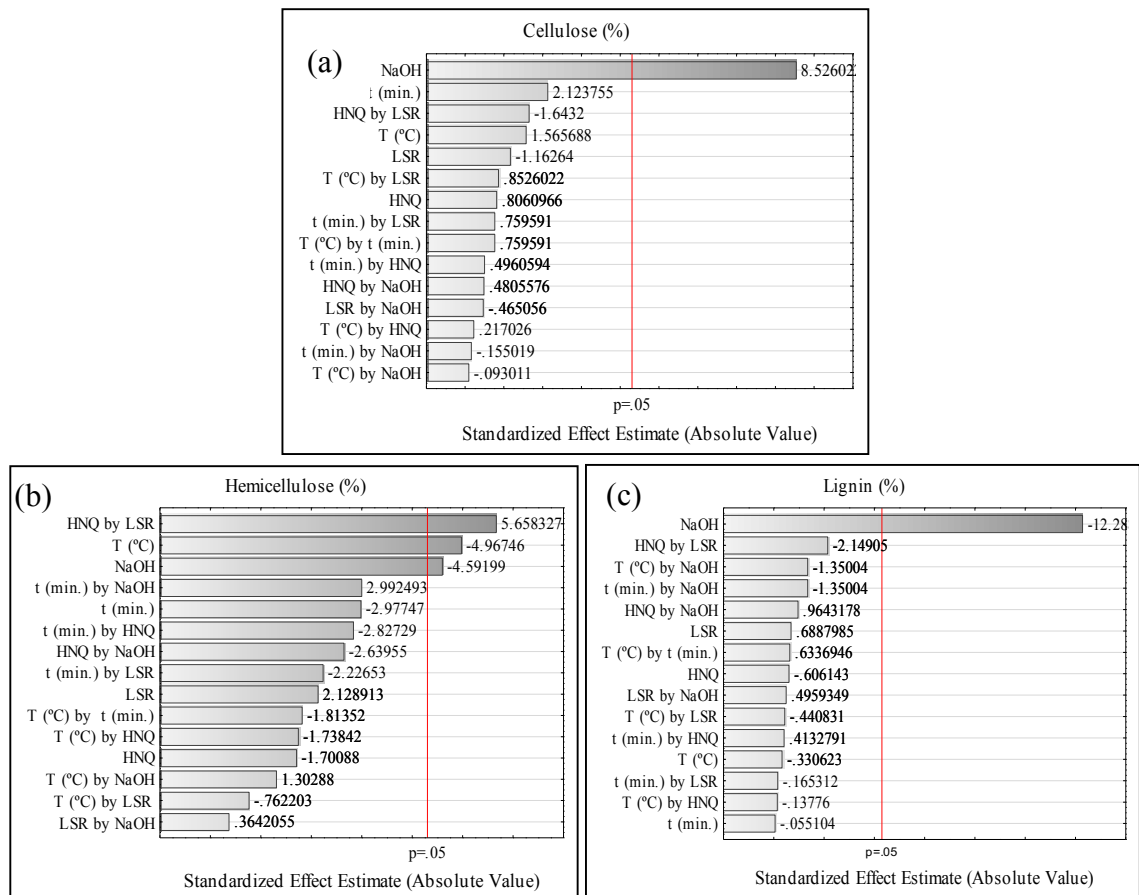


Figure S2: Pareto Chart with first and second order interactions for the chemical composition solubilization of pretreated bagasse. Temperature ($^{\circ}\text{C}$); time (min); HNQ ($\%, \text{w w}^{-1}$); LSR (mL g^{-1}); NaOH ($\%, \text{w w}^{-1}$).

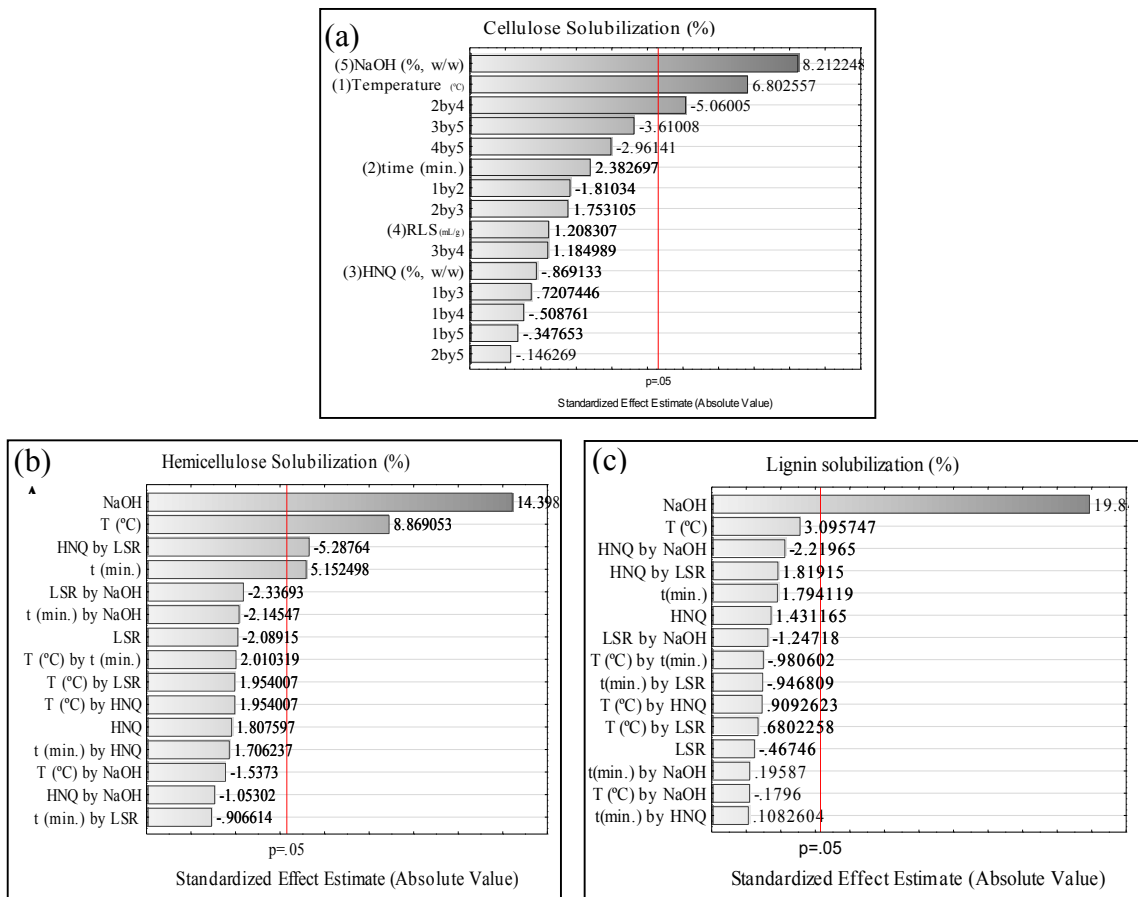


Figure S3: Pareto Chart of central composite with linear and quadratic effects.

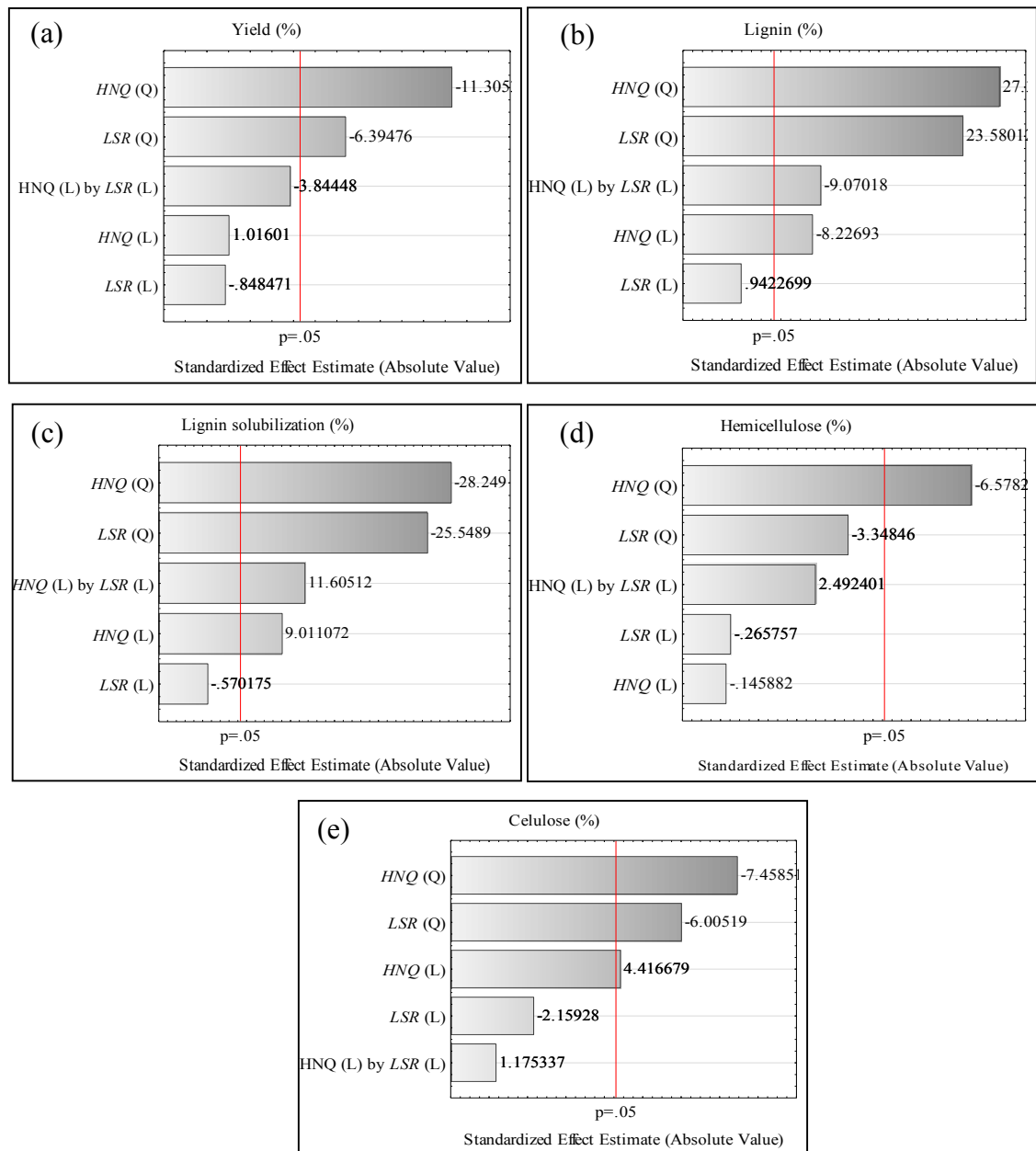


Table S1: Regression coefficients for dependents variable considered in Central Composite design

Coefficient	Yield	CC	HC	Lignin	LR
b_0	55.83844	63.08956	30.19954	6.35891	85.6903
HNQ	0.11908	0.7194	-0.0197	-0.66722	1.39173
$(HNQ)^2$	-1.57708	-1.44597	-1.0571	2.63618	-5.19297
SLR	-0.09944	-0.035171	-0.03588	0.07642	-0.08806
$(RLS)^2$	-0.89206	-1.16422	-0.53808	2.2762	-4.69662
$(HNQ \times SLR)$	-0.63722	0.27074	0.47589	-1.04031	2.5348
R^2	0.62198	0.93455	0.70421	0.69679	0.70497

CC: cellulose composition; HC: hemicellulose composition; LR: lignin removal

7- References

- AGBOR, V.B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol Adv.* n. 29, p. 675-685, 2011;
- BAILEY, S.I., RITCHIE, I.M. A cyclic voltammetric study of the aqueous electrochemistry of some quinones. *Electrochim Acta*, n. 30, p. 3-12, 1985;
- BITTENCOURT, G.A., BARRETO, E.D.S., BRANDAO, R.L., BAETA, B.E.L., GURGEL, L.V.A. Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. *Bioresour Technol*, n. 292, p. 121963, 2019.
- CASPETA, L., CARO-BERMÚDEZ, M.A., PONCE-NOYOLA, T., MARTINEZ, A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energ*, n. 113, p. 277-286, 2014.
- CHAI, X.S., SAMP, J., HOU, Q.X., YOON, S.H., ZHU, J.Y. Possible Mechanism for Anthraquinone Species Diffusion in Alkaline Pulping. *Ind. Eng. Chem. Res.*, n. 46, p. 5245-5249, 2007;
- DIMMEL, D.R. Electron Transfer Reactions in Pulping Systems (I): Theory and Applicability to Anthraquinone Pulping. *J. Wood Chem. Technol.*, n. 5, p. 1-14., 1985;
- GHAFFAR, S.H., FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass Bioenerg.*, n. 57, p. 264-279, 2013;
- GOLSCHIMDT, O. 1971. Ultraviolet Spectra. in: Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions, (Eds.) K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig, Wiley-Interscience. New York, pp. 241-266;
- GURGEL, L. V. A.; PIMENTA, M. T. B.; CURVELO, A. A. D. S. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO₂). *Industrial Crops and Products*, v. 57, p. 141-149, 2014;
- HALLAC, B.B., RAGAUSKAS, A.J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuel, Bioprod and Bior.* n. 5, p. 215-225, 2011;
- HIJJI, Y.M., BARARE, B., ZHANG, Y. Lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) as a sensitive cyanide and acetate sensor. *Sensor Actuat B-Chem.*, n. 169, p. 106-112, 2012;
- KUBES, G.J., FLEMING, B.I., MACLEOD, J.M., BOLKER, H.I. Alkaline pulping with additives. A review. *Wood Sci Technol.*, n. 14, p. 207-228, 1980.
- KUMARI, D., SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, n. 90, p. 877-891, 2018.
- LAI, C., TU, M., YONG, Q., YU, S. Disparate roles of solvent extractable lignin and residual bulk lignin in enzymatic hydrolysis of pretreated sweetgum. *RSC Adv.*, n. 5, p. 97966-97974, 2015.

LAMOUREUX, G., PEREZ, A.L., ARAYA, M., AGÜERO, C. Reactivity and structure of derivatives of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone). *J Phys Org Chem.*, n. 21, p. 1022-1028, 2008.

LISBOA, S.A., EVTUGUIN, D.V., NETO, C.P., GOODFELLOW, B.J. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. *Carbohydr. Polym.*, v. 60, p. 77-85, 2005.

LIU, C.-G., XIAO, Y., XIA, X.-X., ZHAO, X.-Q., PENG, L., SRINOPHAKUN, P., BAI, F.-W. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnol Adv.*, v. 37, p. 491-504, 2019.

MENEZES, F.F., RENCORET, J., NAKANISHI, S.C., NASCIMENTO, V.M., SILVA, V.F.N., GUTIÉRREZ, A., DEL RÍO, J.C., DE MORAES ROCHA, G.J. Alkaline Pretreatment Severity Leads to Different Lignin Applications in Sugar Cane Biorefineries. *ACS Sustain Chem Eng.*, v. 5, p. 5702-5712, 2017;

MIN, D.-Y., LI, Q., CHIANG, V., JAMEEL, H., CHANG, H.-M., LUCIA, L. The influence of lignin-carbohydrate complexes on the cellulase-mediated saccharification I: Transgenic black cottonwood (western balsam poplar, *California poplar*) *P. trichocarpa* including the xylan down-regulated and the lignin down-regulated lines. *Fuel.*, n. 119, p. 207-213, 2014;

MOHD AZHAR, S.H., ABDULLA, R., JAMBO, S.A., MARBAWI, H., GANSAU, J.A., MOHD FAIK, A.A., RODRIGUES, K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys.*, v. 10, p. 52-61, 2017;

NASCIMENTO, V.M., MANRICH, A., TARDIOLI, P.W., GIORDANO, R.D.C., ROCHA, G.J.D.M., GIORDANO, R.D.L.C. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol*, v. 2, p. 112-125, 2016a;

NASCIMENTO, V.M., NAKANISHI, S.C., ROCHA, G.J.M., RABELO, S.C., PIMENTA, M.T.B., ROSSELL, C.E.V. Effect of Anthraquinone on Alkaline Pretreatment and Enzymatic Kinetics of Sugarcane Bagasse Saccharification: Laboratory and Pilot Scale Approach. *ACS Sustain Chem Eng.*, v. 4, p. 3609-3617., 2016b;

NOSRATI-GHODS, N., HARRISON, S.T.L., ISAFIADE, A.J., TAI, S.L. Ethanol from Biomass Hydrolysates by Efficient Fermentation of Glucose and Xylose – A Review. *ChemBioEng Reviews.*, v. 5, p. 294-311, 2018;

REVENGA, J., RODRÍGUEZ, F., TIJERO, J. Solubility of anthraquinone in alkaline solutions of sodium sulfide. *Can J Chem Eng.*, v. 74, p. 118-123, 1996;

ROBAK, K., BALCEREK, M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technol Biotechnol.*, v. 56, p. 174-187 , 2018;

ROCHA, G.J.D.M., NASCIMENTO, V.M., GONÇALVES, A.R., SILVA, V.F.N., MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. *Ind. Crop. Prod.*, v. 64, p. 52-58, 2015;

SAAD, S.M., NADA, A.M.A., IBRAHIM, A.A., TAWFIK, H. Soda Anthraquinone Pulping of Bagasse. *Holzforschung*, v. 42, p. 67-69, 1988.

SANTOS, A.C., XIMENES, E., KIM, Y., LADISCH, M.R. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic. *Biomass. Trends Biotechnol.*, v. 37, p. 518-531, 2019;

SJÖSTRÖM, E. The behavior of wood polysaccharides during alkaline pulping processes. *Tappi J.*, v. 60, p.151-154, 1977.

SOLOMON, O.F., CIUTĂ, I.Z. Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 6, p. 683-686, 1962;

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, p. 1-11, 2002;

VROOM, K.E.. The "H" Factor: A means of expressing cooking times and temperatures as a single variable. *Pulp Paper Mag Can.*, v. 58, p. 228-231, 1957;

XUE, Y., JAMEEL, H., PHILLIPS, R., CHANG, H.-M. Split addition of enzymes in enzymatic hydrolysis at high solids concentration to increase sugar concentration for bioethanol production. *J. IND. ENG. CHEM.*, v. 18, p. 707-714, 2012;

YANG, H., XIE, Y., ZHENG, X., PU, Y., HUANG, F., MENG, X., WU, W., RAGAUSKAS, A., YAO, L. Comparative study of lignin characteristics from wheat straw obtained by soda-AQ and kraft pretreatment and effect on the following enzymatic hydrolysis process. *Bioresour. Technol.*, v. 207, p. 361-369, 2016;

CAPÍTULO III

Otimização da eficiência da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ com elevado teor de sólidos e baixa carga de enzimas por estratégia de bateada alimentada com adição do surfactante *Tween 80*

Otimização da eficiência da hidrólise enzimática em bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ com elevado teor de sólidos e baixa carga de enzimas por estratégia de bateada alimentada com adição do surfactante *Tween 80*

1- Introdução

A hidrólise enzimática representa de 25 a 30 % dos custos operacionais para a produção de etanol 2G, principalmente devido ao elevado custo do coquetel enzimático necessário para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos (ROCHA-MARTÍN *et al.*, 2017). Por isso vários trabalhos estão sendo desenvolvidos para minimizar esses problemas como por exemplo: mutagênese de organismos específicos para que haja hiperprodução de enzimas lignocelulolíticas (CHEN *et al.*, 2020); mistura de enzimas com alta sinergia (SILVA *et al.*, 2016); adição de surfactantes ou proteínas que reduzem a ligação inespecífica de enzimas na lignina (MÉNDEZ ARIAS *et al.*, 2017); sacarificação e fermentação simultâneas (KELBERT *et al.*, 2016).

Além disso, conduzir os ensaios com altas cargas de sólidos é uma estratégia para aumentar a concentração final de açúcares destinados à fermentação e reduzir o consumo de água durante a etapa de hidrólise enzimática. Considera-se elevada carga de sólidos quando a proporção de líquido-sólido é baixa, havendo pouca quantidade de água livre presente no meio reacional, o que equivale a aproximadamente, a uma carga sólida igual ou superior a 15 % (m v⁻¹)(LIU *et al.*, 2015). Entretanto dificuldades decorrentes principalmente da importância da água no processo de hidrólise enzimática são relatadas.

A água aumenta a eficácia das reações enzimáticas e químicas, principalmente ao fornecer um meio para hidrolisar, solubilizar e, portanto, auxiliar na transferência de massa dos produtos de hidrólise. A água também reduz a viscosidade e aumenta o grau de hidratação das partículas, o que diminui a tensão necessária para produzir uma determinada taxa de cisalhamento, permitindo menor entrada de energia para a mistura. Por outro lado, estabelecer processos de hidrólise enzimática com elevado teor de sólidos pode gerar hidrolisados com concentrações mais elevadas de açúcares e, portanto, reduzir os custos associados à operação de destilação (MODENBACH & NOKES, 2013).

Nesse contexto, uma abordagem que tem sido explorada é iniciar a hidrólise enzimática com uma carga moderada de massa lignocelulósica e, após um tempo considerável do experimento, são fornecidas doses definidas de biomassa de tempos em tempos. Desta forma, uma carga efetiva equivalente a um processo de alto teor de sólidos é alcançada (HERNÁNDEZ-BELTRÁN & HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018). Entretanto, embora a otimização da estratégia para hidrólise enzimática de alto teor de sólidos tenha

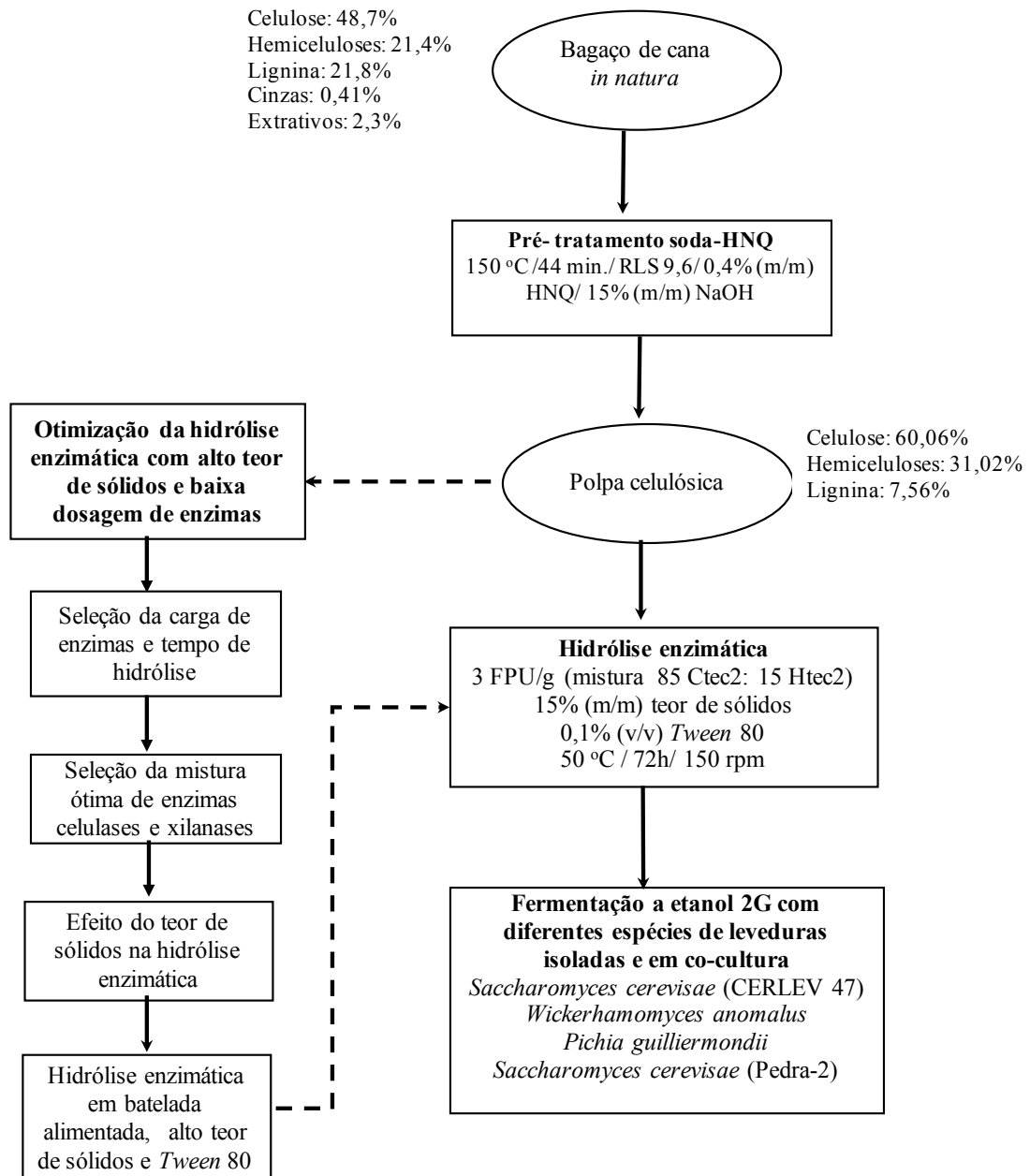
sido amplamente relatada, a dosagem de celulasas na maioria dos estudos foi igual ou superior a 10 FPU / g de biomassa pré-tratada (GODOY *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018; JUNG *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste capítulo foi otimizar as condições de hidrólise, do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com soda/HNQ, visando obter elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, em ensaios com baixa carga de enzimas e elevado teor de sólidos. Para isso, foram selecionadas as variáveis mais importantes para o processo de hidrólise enzimática, como tempo (h), carga de enzimas (FPU g⁻¹), composição do coquetel enzimático (mistura dos coquetéis comerciais Ctec:Htec) e teor de sólidos (% m v⁻¹). Posteriormente foram avaliadas a viabilidade da utilização da estratégia de batelada alimentada e a adição do surfactante Tween 80, visando obter elevada conversão da biomassa em ensaios com 15 % de sólidos. Finalmente, o hidrolisado produzido foi fermentado a etanol de segunda geração pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (CERLEV 47), *Wickerhamomyces anomalus* (CERLEV 1105), *Pichia guilliermondii* (CERLEV 1015) e *Saccharomyces cerevisiae* (Pe-2) isoladas e em co-cultivo.

2- Metodologia

A metodologia utilizada nesse trabalho foi conduzida conforme o fluxograma da Figura 1:

Figura 1: Fluxograma simplificado da metodologia utilizada nesse trabalho



2.1- Pré tratamento do bagaço de cana

O bagaço de cana (BC) foi pré-tratado por processo soda/HNQ, em reator de aço inoxidável (20 L), equipado com sistema de arrefecimento (serpentina) para controle de

temperatura e sistema de circulação interna do licor durante o pré-tratamento (Parr instrumentos, modelo 4848M).

O reator foi carregado com 500 g, em base seca, de bagaço de cana de açúcar. As condições de tratamento foram 15 % (m m⁻¹) de NaOH, razão líquido sólido de 9,57 mL g⁻¹ e 0,4 % (m m⁻¹) de HNQ. O reator foi aquecido até a temperatura de 150 °C e o tempo de tratamento, de ~44 min, foi determinado pelo Fator- H igual a 166, que foi calculado pela equação 1:

$$H = \int_0^t e^{\left(43,2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (1)$$

sendo t é o tempo de reação (min) e T a temperatura (graus kelvin) (NÚÑEZ *et al.*, 2012). Ao final do tempo de pré-tratamento, o reator foi despressurizado lentamente e a fração sólida, denominada de polpa celulósica, foi separada em peneira de 200 *mesh* (0,075 mm), e lavada em água de torneira. O BC pré-tratado foi desfibrado em um desfibrador equipado com copo de inox com capacidade para 25 L (Siensem, modelo LSB 25). O excesso de água foi retirado em centrífuga com capacidade para 10,30 kg (Arno, modelo Classic) e o material foi desintegrado mecanicamente (Weg, modelo FD31196). A fração sólida foi utilizada para determinação da composição química (TAPPI-T222 om-02 e NREL LAP-004, descritas no capítulo II) e para a determinação dos parâmetros de otimização da hidrólise enzimática.

2.2- Otimização das condições de hidrólise enzimática

2.2.1- Ensaios de hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ foram realizados em frascos Erlenmeyer de 25 ou 50 mL e volume de trabalho de 5 ou 10 mL, respectivamente. Os ensaios foram realizados em tampão citrato de sódio, 50 mmol L⁻¹ pH 5, suplementado com 0,01 % (m v⁻¹) de azida de sódio, para evitar contaminação microbiana. As condições de carga de enzimas, tempo de hidrólise e teor de sólidos foram alteradas de acordo com os parâmetros avaliados e os ensaios foram realizados em agitador orbital a 150 rpm e 50 °C. Após o tempo de hidrólise, os frascos foram colocados em banho maria em ebulição por 5 min para paralisar a reação, e centrifugados por 10 min a 3000 x g para separar as frações líquida e sólida. O sobrenadante foi coletado para análises dos açúcares redutores produzidos.

A análise dos açúcares redutores foi realizada pelo método espectrofotométrico usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A quantificação foi realizada por regressão linear de uma curva padrão de glicose (0,5-10 mg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em concentração de açúcar produzido, em g L⁻¹ e o rendimento de ART foi determinada conforme a equação 2.

$$\text{Rendimento de ART} / (\text{g g}^{-1}) = \frac{\text{ART}}{m_i} \quad (2)$$

sendo ART a massa (g) de açúcar redutor produzido durante a hidrólise e m_i a massa (g), em base seca, inicial do bagaço pré-tratado utilizado nos ensaios.

2.2.2- Planejamento experimental composto central e análises estatísticas

Com o objetivo de selecionar as condições que minimizem os custos operacionais, inicialmente foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para analisar o efeito da carga de enzimas e do tempo de hidrólise no material pré-tratado soda/HNQ. Para isso, foi construído um planejamento experimental do tipo composto central 2², ou seja, dois fatores em dois níveis, incluindo três replicatas no ponto central.

As variáveis independentes foram carga de enzimas (1,55, 3, 6,5, 10 e 11,45 FPU g⁻¹) e tempo de hidrólise (9,23, 20, 46, 72 e 82,76 h) que combinadas entre si, em dois níveis (-1 e +1), deram origem as condições apresentadas na Tabela 3. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com teor de sólidos de 10 % (m v⁻¹) e coquetel de celulasas Cellic Ctec 2 (Novozymes).

As análises estatísticas foram realizadas com nível de confiança de 95% utilizando o programa STATISTICA (StatSoft Inc. versão enterprise 10.0). A relação matemática entre as variáveis independentes (IVs) carga de enzimas ($C_{enzimas}$, FPU g⁻¹) e tempo de hidrólise (TH , em h) e a variável dependente (VD) concentração de açúcares redutores totais, (ART, g L⁻¹) pode ser representada pela equação polinomial de segundo grau (equação 3), a partir da qual foi construído o gráfico de superfície de resposta:

$$VD = b_0 + b_1(C_{enzimas}) + b_2(TH) + b_{11}(C_{enzimas})^2 + b_{22}(TH)^2 + b_{12}(C_{enzimas} \times TH) \quad (3)$$

sendo b_0 o termo independente, b_1 e b_2 os coeficientes lineares, b_{11} e b_{22} coeficientes quadráticos e b_{12} o coeficiente de interação. O ajuste da equação do modelo foi verificado pelo valor do coeficiente de determinação (R^2) e a significância estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) combinada à aplicação do teste F .

2.2.3- Seleção da mistura dos coquetéis enzimáticos

Foi avaliada a proporção ideal dos coquetéis Cellic Ctec 2 (complexo de celulases, alto nível de β -glicosidase e baixa carga de hemicelulases) e Cellic Htec 2 (endoxilases com baixa atividade de celulases), para maximizar a liberação de açúcares fermentescíveis nos ensaios de hidrólise. Para isso, foram testadas seis combinações das misturas enzimáticas (Tabela 4), sendo (Ctec:Htec em %, $v v^{-1}$) 85:15, 75:25, 50:50, 25:75, 15:85 e 0:100. Os ensaios foram realizados com 3 FPU g^{-1} de bagaço pré-tratado, 10 % ($m v^{-1}$) de sólidos, durante 72 h, a 50 °C, com agitação de 150 rpm.

2.2.4- Hidrólise enzimática em batelada e batelada alimentada

A hidrólise enzimática do substrato pré-tratado foi realizada em diferentes cargas de substrato (8-21 %, $m v^{-1}$) e em sistema de batelada alimentada, com carga inicial de 12 % ($m v^{-1}$). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 25 mL ou 50 mL, com volume final de 5 mL ou 10 mL, respectivamente.

Após estabelecer o teor de sólidos nos ensaios, foi avaliado o efeito da adição de 0,1 % ($v v^{-1}$) de *Tween* 80 em batelada e em batelada alimentada. Os ensaios em batelada alimentada foram conduzidos conforme o modo de alimentação apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Modo de alimentação nos ensaios de hidrólise enzimática em batelada alimentada^a

Tempo (h)	0	8	18	29	47	
	S (g)	S (g)	ST (mL)	ST (mL)	S (g)	S (g)
Alimentação	0,6	0,6	1	2	0,3	0,15
Carga de sólidos acumulada (%) ^b	12	18,05	15,69	12,44	14,33	15,2
Carga de enzimas (FPU g^{-1})	8,3	4,1	4,1	4,1	3,3	3,0

S: carga de sólidos; ST: solução tampão; ^aHidrólise enzimática iniciada com conteúdo de 12% de sólidos e uma carga de celulases de 3 FPU g^{-1} de substrato em solução tampão citrato de sódio (5 mL, 50 mmol L^{-1} , pH 5), suplementado com 0,1 ($v v^{-1}$) de *Tween* 80, por 72 h; ^b não considera a liquefação do sistema reacional.

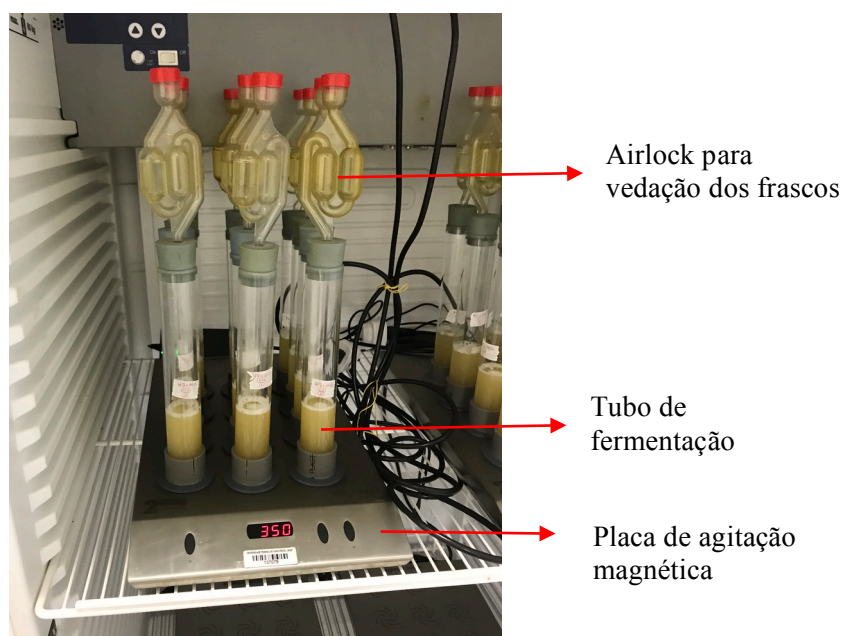
Após selecionar as condições experimentais, os ensaios foram reproduzidos em frascos Erlenmeyer de 2 L, com volume de reação e massa final de 550 mL e 82,5 g, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

2.2.5- Fermentação a etanol

Para a realização desta etapa do trabalho, foram avaliadas quatro cepas de leveduras, com cultivos isolados e em consórcios. As espécies utilizadas foram *Wickerhamomyces anomalus* (CERLEV 1105) e *Pichia guilliermondii* (CERLEV 1015), isoladas em dorna de fermentação de cachaça (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015), e duas cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* (CERLEV 47 e Pe-2). A produção de etanol de segunda geração foi realizada pelas espécies isoladas e pelos consórcios Pe-2/CERLEV 1105, Pe-2/CERLEV 1015, CERLEV 47/CERLEV 1105, CERLEV 47/CERLEV 1015.

As leveduras foram ativadas em 5 mL de meio de cultura YPD 2 % (Extrato de levedura e peptona), composto por extrato de levedura 1 % ($m v^{-1}$), peptona 2 % ($m v^{-1}$), glicose 2 % ($m v^{-1}$) como fonte de carbono e água destilada. Posteriormente, as leveduras foram incubadas a 30 °C, sob agitação durante 24 h. A partir desse pré-cultivo, estas foram inoculadas em 500 mL de meio YPD 2 % e a cultura foi incubada a 30 °C, sob agitação (200 rpm) durante 24 h. Os ensaios de fermentação foram realizados com a quantidade de células correspondendo a densidade óptica (D.O.) igual a 3. As células foram concentradas por centrifugação a 3000 x g (microcentrifuga Eppendorf 5415D) por 5 min e inoculadas nos tubos para a fermentação contendo, separadamente, 50 mL de cada hidrolisado enzimático. Posteriormente foram incubados a 30 °C, com agitação a 350 rpm (Figura 2), durante 140 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 2: Sistema utilizado na fermentação a etanol com agitação de 350 rpm.



O desempenho fermentativo foi avaliado pesando os frascos de tempos em tempos e a perda de massa (g) foi utilizada para estimar a produção de etanol, a partir da equação 4:

$$\text{Produção estimada de etanol} / (g L^{-1}) = \frac{\left(\text{Perda de massa (g)} \times \frac{92 g mol^{-1}}{88 g mol^{-1}} \right) \times 1 (L)}{0,05 (L)} \quad (4)$$

sendo que $92 g mol^{-1}$ corresponde a massa de duas moléculas de etanol, $88 g mol^{-1}$ corresponde a massa de duas moléculas de gás carbônico, geradas a partir das moléculas de glicose e xilose durante a fermentação e $0,05 L$ corresponde ao volume do ensaio.

Ao final das fermentações, os sobrenadantes foram coletados para quantificação dos açúcares residuais e etanol por CLAE, usando um cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity II, equipado com coluna Aminex HPX-87H ($300 \times 7,8 mm$) e detector de índice de refração. Como eluente foi utilizado $0,005 mol L^{-1}$ de H_2SO_4 em um fluxo de $0,6 mL min^{-1}$ operado a $55 ^\circ C$.

2.2.6- Estimativa do balanço de energia para o fracionamento do bagaço de cana por soda-HNQ

A estimativa do balanço energético para o fracionamento do BC foi realizada considerando a quantidade de energia consumida na etapa de pré tratamento em

comparação com a quantidade de energia gerada pela combustão dos componentes do licor negro.

A energia consumida no pré tratamento soda-HNQ foi estimada a partir da energia necessária para aquecer a entrada de BC a 25 ° C até a temperatura da reação (150 ° C) e para aquecer a água (RLS de 9,6 L kg⁻¹) de 100 ° C a 150 ° C, conforme mostrado na equação 5:

$$E_{T(-),PT} = \left[C_{p,BC} \times m_{BC} \times (T_{PT,T} - T_{BC,25^\circ}) \right] + \left\{ \left[C_{p,H_2O} \times RLS \times \rho_{H_2O} \times (T_{PT,T} - T_{H_2O,100^\circ C}) \right] \times m_{BC} \right\} \quad (5)$$

onde $E_{T(-),PT}$ (MJ) é a energia térmica consumida no pré tratamento soda-HNQ do BC, $C_{p,BC}$ e C_{p,H_2O} são as capacidades de calor específicas do BC (0,00176 MJ (kg ° C)⁻¹) e água (0,00419 MJ (kg ° C)⁻¹) (KLING et al., 1987), respectivamente, m_{BC} (kg) é a massa de BC utilizada, T_{PT} é a temperatura do pré tratamento soda-HNQ (150 ° C), T_{SB} , 25 ° C e T_{H_2O} , 100 ° C (° C) são as temperaturas de entrada do BC (25 ° C) e água (100 ° C), respectivamente, RLS (L kg⁻¹) é a razão líquido / sólido e ρ_{H_2O} (kg L⁻¹) é a gravidade específica da água.

Após a etapa de pré tratamento, o material foi submetido a desfibrilação mecânica (D) e secagem por centrifugação (C). As energias consumidas nessas etapas foram calculadas pela equação 6.

$$E_{E(-),D,C}/KWh = (P_{top})0.278 \quad (6)$$

onde $E_{E(-),D,C}$ (kWh) é a energia consumida nas etapas de D e C, P é a potência do equipamento usado (1100 W para D e 140W para C), t_{op} (h) é o tempo de operação do equipamento e 0,278 é o fator de conversão para kWh.

Na combustão do licor negro foram considerados os poderes caloríficos da celulose, hemiceluloses e lignina de 17 MJ/kg, 16,63 MJ/kg, e 26,7 MJ/kg, respectivamente (MURPHEY; MASTERS, 1978).

3- Resultados e discussão

3.1- Composição química do material pré-tratado com soda/HNQ

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nesse estudo foi de 48,7 % de celulose, 21,4 % de hemiceluloses, 21,8 % de lignina, 2,3 % de extrativos e 0,41 % de sais minerais (inorgânicos). Esta composição se aproxima de trabalhos descritos na literatura (PIPPO *et al.*, 2011;LIMA *et al.*, 2018).

Como demonstrado em trabalho anterior (capítulo II desta tese), a molécula 2-hidróxi-1,4-naftoquinona (HNQ) é um interessante mediador redox, capaz de promover a preservação das frações de celulose e hemiceluloses durante o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio, além de melhorar a deslignificação do material, sem causar prejuízos nos rendimentos da hidrólise enzimática. A efetividade da molécula está relacionada à estabilização dos carboidratos por reduzir a despolimerização alcalina terminal (efeito de *peeling*) e, assim como a antraquinona, promover a formação de ácidos aldônicos nos grupos terminais dos polissacarídeos, preservando-os (JIMÉNEZ *et al.*, 2009).

No entanto, os dados de otimização da carga da HNQ e seus efeitos positivos na deslignificação do bagaço de cana e na preservação da fração de polissacarídeos desta biomassa se referem a um sistema estático em batelada e em menor escala (425 mL). No presente trabalho, foi testado reator em maior escala (20 L), com sistema de rampa de aquecimento e circulação do licor alcalino.

Conforme mostrado na Tabela 2, houve diferença ($p < 0,05$) entre os teores de celulose das biomassas pré-tratadas em maior e menor escala. O bagaço de cana pré-tratado no reator em maior escala apresentou teor de celulose 5,06 % inferior ao tratamento em menor escala. Esse resultado pode estar relacionado ao sistema de circulação do licor alcalino, que retira 300 mL da solução de pré-tratamento e mobiliza cerca de 0,12 g do mediador redox do meio reacional. Isso faz com que a composição do meio (8,97 mL g⁻¹ e 0,376 % de HNQ) seja levemente diferente da condição otimizada em reator em menor escala (9,57 mL g⁻¹ e 0,4 % de HNQ). Entretanto, os dados de solubilização da celulose não apresentaram diferença estatística e por isso, pode-se considerar que o mediador redox manteve a eficiência na preservação da celulose, mesmo no sistema com rampa de aquecimento e recirculação do licor alcalino.

Tabela 2: Composição química e solubilização dos componentes estruturais do bagaço de cana pré-tratado soda-HNQ em maior e menor escala

PT soda-HNQ	Rendimento / (%)	Lignina insolúvel / (%)	Celulose / (%)	Hemiceluloses / (%)	RC / (%)	RH / (%)	RL. / (%)
Maior escala	59,4	7,56±1,0	60,06±0,2	31,02±1,7	26,8 ±0,3	12,90±4,6	81,90±2,3
Menor escala	57,1	6,05±0,4	65,12±0,5	31,91±0,4	23,63 ± 1,6	13,79±2,3	86,07±0,6
BC não tratado	100	21,8±0,4	48,7±0,5	21,4±0,2	-	-	-

PT: pré tratamento; O rendimento corresponde à massa recuperada após o pré tratamento; RC: remoção de celulose; RH: remoção das hemiceluloses; RL: remoção da lignina; BC: Bagaço de cana

Segundo Nascimento *et al.* (2016), condições experimentais, como temperatura, rampa de aquecimento, tempo de reação e sistema de agitação são os principais fatores que influenciam nas taxas de difusão do mediador redox. Conseqüentemente, diferentes concentrações de catalisador na fibra, podem ter ocasionado a diferença no teor de celulose. Entretanto, a HNQ possui um grupamento OH no carbono 2 do anel aromático, que aumenta a sua solubilidade em meio básico e, portanto, facilita a difusão nas fibras, mesmo em sistema estático, o que poderia explicar a semelhança na solubilização da celulose, nos dois tipos de sistemas, em comparação com a AQ.

3.2- Seleção das variáveis-chave e coquetel enzimático para hidrólise enzimática com elevado teor de sólidos

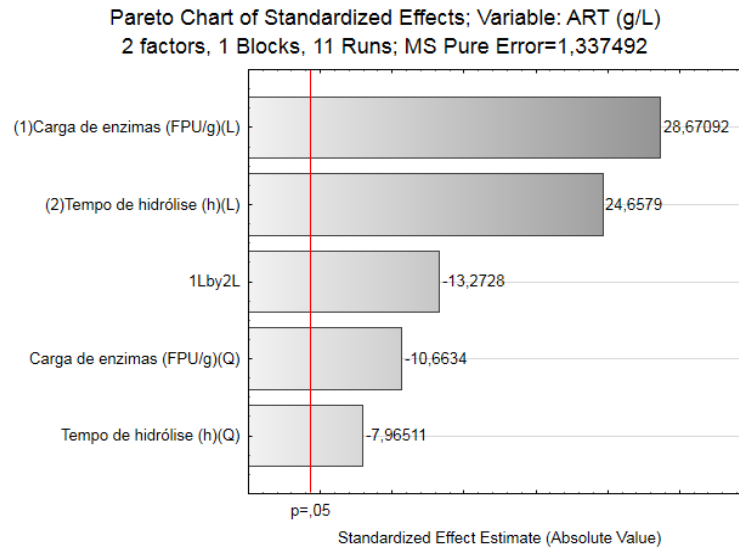
Inicialmente foram selecionadas as condições de carga de enzimas e tempo de hidrólise. Para isso, foi gerado planejamento experimental composto do tipo 2² em que as variáveis independentes foram carga de enzimas (1,5 a 11,45 FPU g⁻¹) e tempo de hidrólise (9,23 a 82,76 h) e a variável resposta foi a liberação de açúcares redutores totais (ART), conforme Tabela 3. Os ensaios foram realizados com o coquetel celulolítico Celic Ctec 2 (Novozymes) e teor de sólidos de 10 %.

Tabela 3: Condições experimentais geradas pelo delineamento experimental Composto Central para seleção das condições de carga de enzimas e tempo de hidrólise sobre a variável resposta, açúcar redutor total (ART) e conversão da biomassa a açúcares redutores

Ensaio	Carga de enzimas / (FPU g ⁻¹)	t / (h)	ART produzido / (g L ⁻¹)	ART produzido / (g g ⁻¹)	CE _G / (%)	CE _X / (%)
1	3	20	33,77±0,51	0,34± 0,01	27,34±1,06	25,66±0,86
2	3	72	68,26±12,71	0,67 ± 0,44	65,91±8,01	50,52±7,47
3	10	20	64,97 ± 1,60	0,64 ± 0,02	65,69±0,37	49,05±4,34
4	10	72	68,76 ± 0,79	0,68 ± 0,01	77,30±1,88	63,35±1,44
5	1,55	46	35,08 ± 0,63	0,35 ± 0,01	28,01±0,59	30,41±0,86
6	11,45	46	78,98 ± 1,57	0,78 ± 0,02	78,77±1,53	63,65±1,14
7	6,5	9,23	44,67 ± 0,51	0,45 ± 0,01	44,02±0,77	41,59±1,45
8	6,5	82,76	74,64 ± 1,68	0,74 ± 0,02	72,42±4,19	57,52±9,72
9	6,5	46	66,55 ± 2,64	0,66 ± 0,03	74,90±3,06	53,75±3,61
10	6,5	46	68,86 ± 1,12	0,68 ± 0,01	77,47±1,62	60,40±0,12
11	6,5	46	67,71 ± 1,79	0,67 ± 0,02	76,19±2,34	58,99±1,79

t: tempo; ART: açúcar redutor total; CE_G: conversão enzimática a glicose; CE_X conversão enzimática a xilose

As análises estatísticas, realizadas com 95% de confiança, mostraram que tanto a carga de enzimas quanto o tempo de hidrólise apresentaram efeito linear positivo sobre a produção de ART (em g L⁻¹), sendo de 28,7 e 24,7 respectivamente, conforme Figura 3. Isso significa que ambas as variáveis, em seu nível superior, implicam no aumento da produção de ART, enquanto que no nível inferior, a produção de ART diminui.

Figura 3: Diagrama de Pareto para o planejamento experimental composto central 2^2 

A combinação das variáveis (carga de enzimas e tempo de hidrólise) apresentou efeito linear negativo, sendo de -13,27. Isso significa que o menor carregamento de enzimas necessita de maior tempo para liquefazer o material, ou que, ao contrário, a maior quantidade de enzimas necessita de menores tempo para liquefazer o material. Essas respostas podem estar relacionadas à superfície acessível ocasionada pelo pré-tratamento soda/HNQ. Arantes & Saddler (2011) relataram que substratos ricos em celulose altamente acessível exigiam uma menor carga proteica para a obtenção de hidrólise eficiente em comparação com substratos que continham celulose menos acessível. Os pesquisadores concluíram que o passo limitante da hidrólise não foi a clivagem catalítica das cadeias de celulose, mas a acessibilidade limitada das enzimas às cadeias de celulose.

A relação empírica entre as variáveis experimentais carga de enzimas ($C_{enzimas}$) ($FPU\ g^{-1}$), tempo de hidrólise (TH) (h) e a produção de ART (VD) foi expressa na equação (5) de regressão:

$$VD = 67,70767 + 11,723(C_{enzimas}) + 10,083(TH) - 5,189(C_{enzimas})^2 - 3,877(TH)^2 - 7,675(C_{enzimas} \times TH) \quad (5)$$

Conforme mostrado na Tabela 4, o valor de R^2 foi de 0,9508, indicando que o modelo de regressão pode explicar 95,1% da variabilidade na resposta e apenas cerca de 4,9% da variação total não pôde ser atribuído às variáveis. O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}) é a medida de correlação para testar a qualidade do ajuste da equação de

regressão (MEYABADI e DADASHIAN, 2012). Nesse trabalho, o elevado valor de R^2_{adj} (0,9016) sugere que o modelo foi significativo e indica um alto grau de correlação entre os resultados experimentais e os valores previstos. O altos valores de F e os valores de $p < 0,05$ implicam que os termos do modelo são estatisticamente diferentes entre si (KIM, 2014) e por isso reforçam a confiabilidade do modelo.

Tabela 4: Análise de variância para o modelo polinomial quadrático ajustado. Coeficiente de determinação (R^2): 0,9508; Coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}): 0,9016

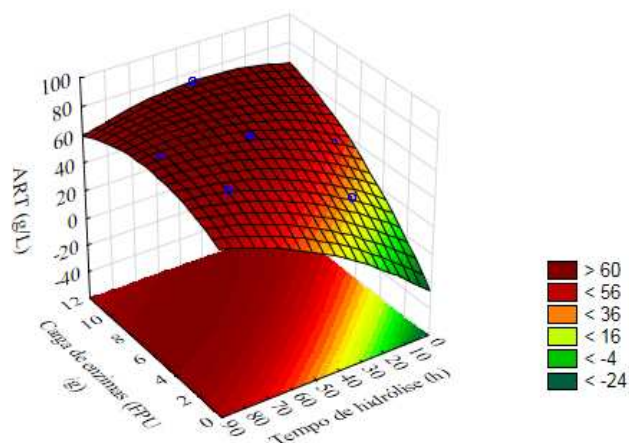
Fator	SQ	GL	média quadrada	Valor de F	p -valor
$C_{enzimas}$ (L)	1099,447	1	1099,447	822,0215	0,001214
TH (L)	813,212	1	813,212	608,0122	0,001641
$C_{enzima} \times TH$	235,622	1	235,622	176,1674	0,005629
C_{enzima} (Q)	152,084	1	152,084	113,708	0,008680
TH (Q)	84,854	1	84,854	63,4429	0,015399
Falta de ajuste	118,197	3	39,399	29,4574	0,033012
Erro puro	2,675	2	1,337		

$C_{enzimas}$: carga de enzimas; SQ : somas dos quadrados; TH : tempo de hidrólise; GL : graus de liberdade; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; $p < 0,05$ indica que as variáveis foram significativas.

O gráfico de superfície de resposta mostra que a produção de açúcar redutor é maior com o aumento do tempo de hidrólise e da carga de enzimas (Figura 4), sendo o ponto crítico observado em 8,70 FPU g^{-1} e 64 h. A maior produção de ART foi observada no ensaio que utilizou 11,45 FPU g^{-1} e 46 h, sendo de 78,98 $g L^{-1}$ ou 0,78 $g g^{-1}$ e a menor conversão foi observada em 3 FPU g^{-1} e 20 h, sendo de 33,77 $g L^{-1}$ ou 0,34 $g g^{-1}$.

Figura 4: Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de hidrólise e da carga de enzimas na produção de açúcares redutores totais (ART)

Fitted Surface; Variable: ART (g/L)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=1,337492



O menor p -valor da carga de enzimas ($p = 0,0012$) indica que o efeito dessa variável sobre o rendimento de açúcares redutores, é mais pronunciado do que o tempo de hidrólise ($p = 0,0016$). Entretanto, como observado nos ensaios 2 (3 FPU g^{-1} , 72 h) e 3 (10 FPU g^{-1} , 20 h), a combinação de cargas mais baixas de enzimas e maiores tempos de hidrólise, e vice versa, permitiram a obtenção de altas concentrações de açúcares redutores (ART), sendo acima de 64 $g L^{-1}$. Como foi demonstrado anteriormente, a hidrólise com baixa carga enzimática é economicamente necessária para a otimização sistemática da produção de etanol (SHEN e AGBLEVOR, 2008). Assim, foram selecionadas a carga de 3 FPU g^{-1} e tempo de 72 h, para os testes subsequentes de otimização.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da suplementação do complexo de enzimas hemicelulolíticas (Cellic Htec 2) ao coquetel Cellic Ctec 2, em seis misturas enzimáticas. Como observado na Tabela 5, a mistura 85 Ctec:15 Htec gerou 98,65 $g L^{-1}$ de ART, sendo 28,79 $g L^{-1}$ maior do que os ensaios realizados somente com o coquetel de celulases. Adicionalmente, as formulações 25 Ctec: 75 Htec e 50 Ctec :50 Htec possibilitaram pequena melhora na produção de ART, sendo de 3,43 $g L^{-1}$ e 3,25 $g L^{-1}$. Entretanto, a adição de mais de 75% do Htec implicou em menores rendimentos de ART quando comparado a utilização do coquetel Ctec 2.

Tabela 5: Avaliação da proporção ideal dos coquetéis enzimáticos de celulasas (Cellic Ctec 2) e hemicelulasas (Cellic Htec 2). Ensaios realizados com 3 FPU g⁻¹, 72 h, 10% (m v⁻¹) de sólidos (Os valores em parênteses indicam a atividade total das celulasas no coquetel concentrado).

Proporção das misturas dos coquetéis	ART produzido no ensaio / (g L ⁻¹)	Conversão do BCPT a ART / (g g ⁻¹)
85 Ctec: 15Htec (117,8 FPU mL ⁻¹)	98,65 ± 0,59	0,9675 ± 0,03
75 Ctec: 25 Htec (79,4 FPU mL ⁻¹)	71,69 ± 1,78	0,72 ± 0,02
50 Ctec: 50 Htec (88,9 FPU mL ⁻¹)	71,51 ± 0,1	0,71 ± 0,0001
25 Ctec: 75 Htec (92,04 FPU mL ⁻¹)	67,67 ± 2,18	0,68 ± 0,02
15 Ctec: 85 Htec (76,5 FPU mL ⁻¹)	57,87 ± 1,63	0,58 ± 0,02
0 Ctec: 100 Htec (53,3 FPU mL ⁻¹)	51,19 ± 0,61	0,51 ± 0,01

BCPT: bagaço de cana pré tratado; ART: açúcar redutor total

O coquetel hemicelulolítico é rico em enzimas acessórias, que hidrolisam as cadeias laterais das hemiceluloses. Além disso, essas enzimas cooperam removendo os locais de ligação lignina-carboidrato, uma vez que os resíduos arabinosila no esqueleto de xilana são covalentemente ligados ao ácido ferúlico e à lignina, e por isso parcialmente responsáveis pela formação de complexos lignina-carboidrato (CINTRA *et al.*, 2020).

Estudos anteriores mostraram que a suplementação do coquetel de celulasas com feruloil esterase, xilanases e arabinofuranosidasas melhorou a hidrólise de materiais pré-tratados, pois facilitaram o acesso das celulasas ao substrato celulósico, aumentando o rendimento de açúcares redutores na hidrólise enzimática (GOLDBECK *et al.*, 2016; CINTRA *et al.*, 2020).

Patel *et al.* (2017) suplementaram o coquetel celulolítico comercial com β-xilosidasas para sacarificar palha de milho pré-tratado alcalino (2 % (m v⁻¹) de NaOH). Após 36 h de hidrólise com 13 FPU g⁻¹ e 74,42 IU g⁻¹ de β-xilosidasas foi obtido rendimento máximo de 0,602 g g⁻¹ de açúcares redutores.

Qing e Wyman (2011) postularam que a adição das hemicelulasas algumas horas antes da adição das celulasas pode maximizar a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Isso se deve ao fato das celulasas e xilanases serem adsorvidas mais

facilmente à xilana, impedindo a atuação imediata sobre a celulose. Sendo assim, a suplementação com hemicelulases oferece a oportunidade de diminuir a carga total de celulasas utilizadas na hidrólise enzimática, além de gerar pentoses que podem ser utilizadas na biorrefinaria lignocelulósica (ALVIRA *et al.*, 2011). Adicionalmente, devido às diferenças estruturais e particulares de cada biomassa e o efeito causado pelo pré-tratamento, há a necessidade de otimizar a formulação das enzimas para cada substrato pré-tratado. Para o bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ a mistura de 85 % Ctec e 15 % Htec gerou os melhores resultados e, por isso foi selecionada para os testes subsequentes.

Posteriormente, a influência da concentração do substrato na produção de açúcares fermentescíveis também foi avaliada. Para isso, os ensaios foram conduzidos nas cargas de 8 a 21 % (m v⁻¹). As demais condições foram 3 FPU g⁻¹, 72 h e coquetel 85 Cetec:15Htec. Como observado na Figura 5, embora a concentração total de açúcar redutor tenha aumentado de 79,56 para 107,31 g L⁻¹, a conversão em massa diminuiu 48,5%, com o aumento de sólidos de 8 para 21 % (Figura 6).

Figura 5: Efeito da concentração do substrato na concentração de açúcares redutores totais produzidos durante a sacarificação

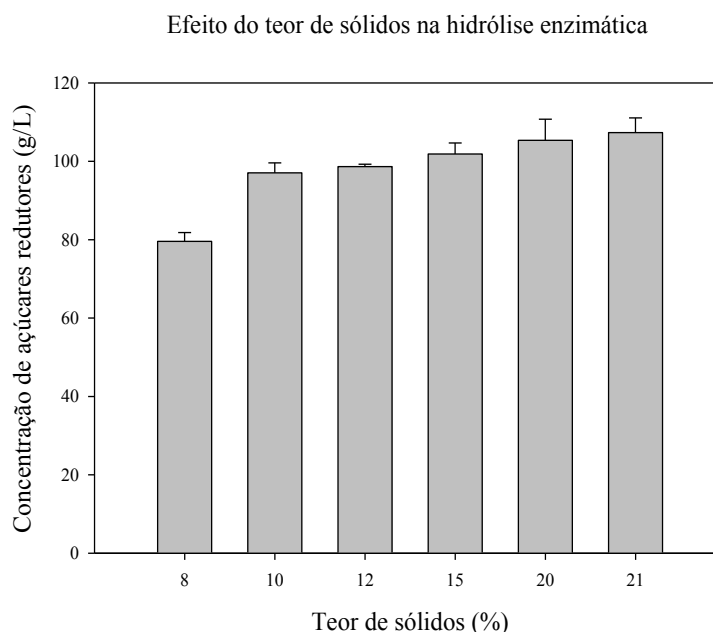
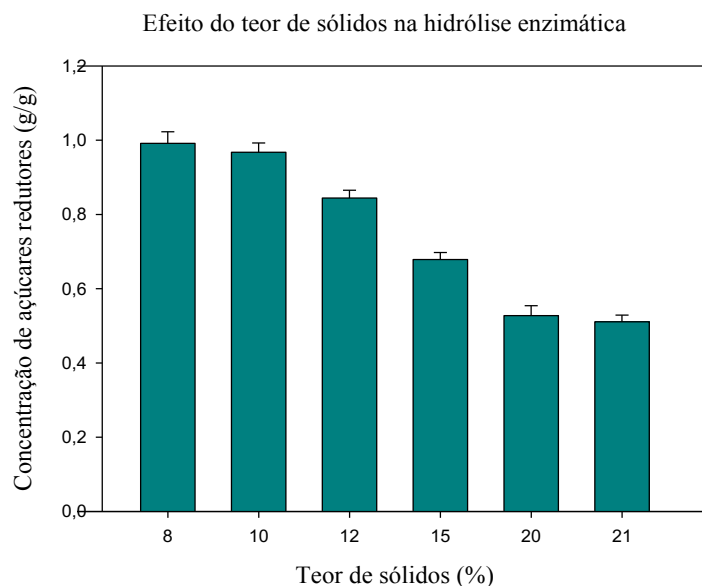


Figura 6: Conversão enzimática da biomassa em açúcares redutores (g g^{-1})

Isso pode ser atribuído a um efeito da inibição pelo produto e/ou problemas físicos relacionados à agitação dificultada do material na solução enzimática (CARA *et al.*, 2007). Além disso, outros trabalhos mostraram que a elevada concentração de substrato também pode interferir nas propriedades de adsorção das celulases, prejudicando o rendimento de açúcares fermentescíveis (HUMBIRD *et al.*, 2010; WANG *et al.* 2011).

Como observado nesse trabalho, os problemas relacionados à utilização de elevado teor de sólidos apareceram, principalmente, nas concentrações $\geq 15\%$, que apresentaram um máximo de 68,4% da conversão em massa (g), relativa ao ensaio com 8% de sólidos (Figura 6). Além disso, o ganho foi de apenas $5,46 \text{ g L}^{-1}$ de ART quando a concentração de sólido variou de 15 para 21%, sendo que, na maior concentração de sólidos, quase a metade da biomassa não foi convertida.

A partir desses dados pôde-se concluir que, para o bagaço de cana pré-tratado soda/HNQ, o máximo da carga de sólidos usada na hidrólise enzimática deve ser de 12%, na qual mais de 80 % da massa seca é convertida em ART, utilizando carga enzimática de apenas 3 FPU g^{-1} com tempo de 72 h. Embora esse resultado seja extremamente promissor, principalmente por utilizar carga enzimática reduzida em relação à concentração de sólidos, para estabelecer um processo de sacarificação utilizando elevado teor de sólidos, que seja técnica e economicamente viável, outras alternativas precisam ser exploradas e avaliadas, como será abordado a seguir.

3.3- Exploração da hidrólise enzimática com elevado teor de sólidos pela estratégia de batelada alimentada e uso de *Tween 80*

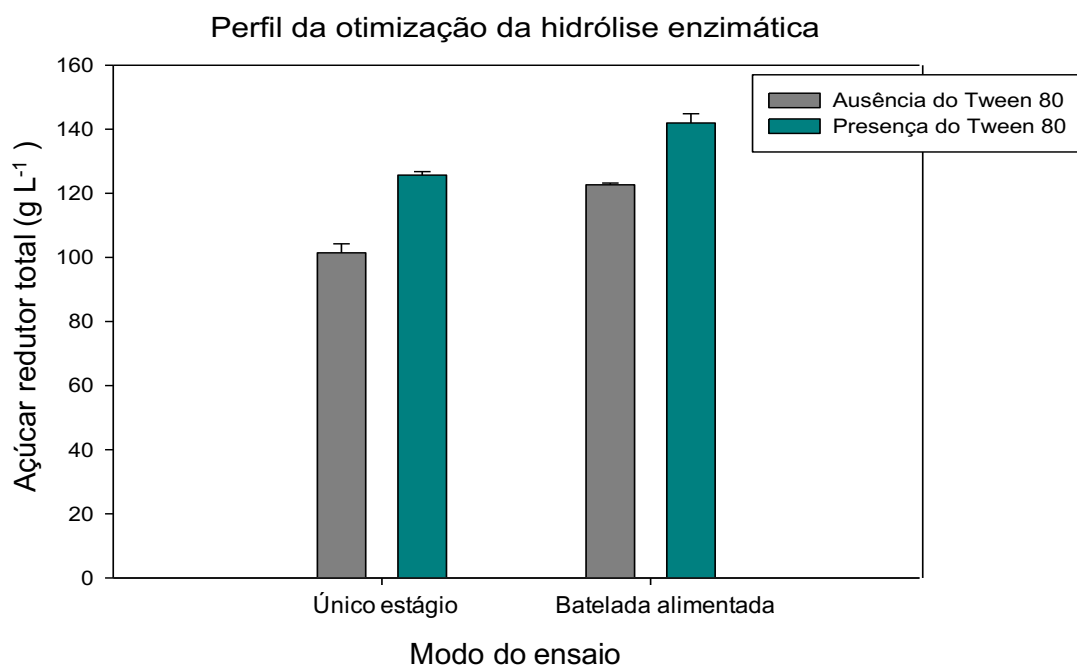
Visando obter um processo de hidrólise enzimática usando elevado teor de sólidos, sem alterar a carga de enzimas já estabelecida de apenas 3 FPU g⁻¹ (coquetel 85% Ctec e 15 % Htec) pelo tempo de 72 h, e que promova a conversão da biomassa pré-tratada ≥ 80 %, foram avaliadas duas estratégias. A primeira tem o objetivo de minimizar os efeitos negativos da baixa quantidade de água livre no sistema, por meio do processo de batelada alimentada. A segunda estratégia é a utilização do aditivo *Tween 80*, que é capaz de melhorar o desempenho das enzimas e prolongar seu período de alta atividade, além de minimizar os efeitos de ligação improdutiva na lignina da biomassa. As estratégias foram avaliadas individualmente e em conjunto.

Para os ensaios de batelada alimentada, a carga total de enzimas foi adicionada no início do experimento e a biomassa foi adicionada após 8, 29 e 47 h, atingindo 15 % (m v⁻¹) de sólidos finais. Além disso, os ensaios foram conduzidos na ausência e presença de 0,1 % (v v⁻¹) de *Tween 80*.

De acordo com a Figura 7, a batelada alimentada possibilitou a obtenção de 122,66 g L⁻¹ de ART, com ganho de 22,18 g L⁻¹ ou 0,1471 g g⁻¹ em relação ao ensaio em batelada único estágio. A estratégia de batelada alimentada pode se beneficiar da baixa viscosidade, pela otimização da razão substrato/enzima no reator. O baixo teor inicial de sólidos fornece às enzimas a oportunidade de hidrolisar e liquefazer os substratos com eficiência e em menor tempo. O líquido livre fica disponível para acomodar mais substrato durante a alimentação. Assim, a elevada concentração de sólidos é mais facilmente acomodada no modo alimentado, sem afetar a reologia da reação (AGRAWAL *et al.*, 2018).

A adição do *Tween 80* melhorou o rendimento de açúcar em 23,9 % e 15,8 % nos ensaios em batelada em único estágio e batelada alimentada, respectivamente. A adição do surfactante aos ensaios em único estágio produziu 125,72 g L⁻¹ de açúcares redutores totais, sendo apenas de 3,06 g L⁻¹ superior ao ensaio de batelada alimentada na ausência do aditivo (Figura 7).

Figura 7: Hidrólise enzimática em modo batelada e batelada alimentada com ausência e presença de 0,1% (m m⁻¹) de *Tween 80*.



Estudos anteriores demonstraram que o *Tween 80* foi capaz de atenuar a adsorção improdutivo entre os componentes da celulase e a lignina (KAAR e HOLTZAPPLE, 1998; OKINO *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2019) relataram uma melhora de 14,8% na conversão da celulose a glicose após utilização de 150 mg g⁻¹ de *Tween 80* em hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tradado alcalino/peróxido de hidrogênio. Os pesquisadores relataram que o surfactante foi capaz de dilatar as fibras, aumentar a área superficial e melhorar a acessibilidade da celulase à celulose.

Também foi sugerido que a presença de surfactantes tem um efeito estabilizador nas enzimas (ERIKSSON *et al.*, 2002). Okino *et al.* (2013) relataram um aumento na taxa de hidrólise por adição de *Tween 80* apenas sob condição de agitação. O grupo verificou que o surfactante impediu a desnaturação de celobiohidrolase II após ser submetida a agitação a 30 °C. A pesquisa também concluiu que o *Tween 80* estabilizou os componentes instáveis da celulase não apenas durante a hidrólise, mas também durante a produção das enzimas.

A estratégia de batelada alimentada colaborou significativamente para obtenção de elevada conversão da biomassa, utilizando elevado teor de sólidos, com baixa carga de enzimas. Adicionalmente, a combinação o uso do *Tween 80* permitiu maximizar os rendimentos de açúcar, resultando em 141,95 g L⁻¹ de ART. As análises por CLAE indicaram uma conversão enzimática de 94,2 % e 79,1 % das frações de celulose e xilana, respectivamente.

Os ensaios em batelada alimentada permitiram atingir, ao final, o máximo de 15 % do teor de sólidos. Entretanto, para atingir elevada conversão utilizando carga de sólidos acima de 15 %, deve ser aplicada uma maior carga de enzimas, para permitir a rápida hidrólise e liquefação do material nas primeiras horas do experimento, o que poderia garantir a adição de substrato fresco em períodos mais curtos. No entanto, como a principal motivação do presente trabalho foi realizar os ensaios com baixa carga de enzimas (3 FPU g⁻¹), foi mantida a carga final de sólidos de 15%.

Considerando trabalhos anteriores apresentados na Tabela 6, pode-se concluir que a utilização da estratégia adotada nesse trabalho foi eficiente para a obtenção de elevados rendimentos de açúcares fermentescíveis com apenas 3 FPU g⁻¹.

Tabela 6: Estratégias adotadas para hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

Biomassa/ pré tratamento	C_{enzima} (FPU/g)	$C_{sólidos}$ (%m/v)	Estratégias de hidrólise	Açúcares gerados	Referência
Madeira (<i>Prosopis juliflora</i>)/4% Cloreto de sódio (4%, m v ⁻¹ , 120°C, 30 min	22	20	Batelada alimentada + aditivos (0,01 % (v v ⁻¹) de <i>Tween</i> 80, 1mM de CuCl ₂)	127 g L ⁻¹ de ART	(GUPTA <i>et al.</i> , 2012)
Bagaço de cana/dois estágios: 1% (m v ⁻¹) H ₂ SO ₄ , 30 min, 121°C, RLS 1:3 e 3% (m v ⁻¹) NaOH, 100°C, 40 min	26	27	Batelada alimentada + aditivo (PEG 4000)	150 g L ⁻¹ de glicose	(GOMES <i>et al.</i> , 2018)
Palha de sorgo/alcalino-oxidativo: 2% (v v ⁻¹) NaOH e 1,5% (v v ⁻¹) peróxido de hidrogênio, pH 11,5, 60°C, 5 h	80,53	20	Batelada alimentada	130 g L ⁻¹ de ART	(HERNÁNDEZ-BELTRÁN e HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018)
Bagaço de cana/40% (m m ⁻¹) de NaOH, 150 rpm, 80°C, 120 min	4	22	Batelada alimentada + aditivos (150 IU de hemicelulases, 60 mg de β-glicosidase, 25 mg de whey protein, 40 mg de <i>Tween</i> 80, 10	122 g L ⁻¹ de glicose	(XU <i>et al.</i> , 2019)

				mg de cálcio lignossulfonato, 25 mg de soforolípido)		
Bagaço de cana/dois estágios: 0,5 (v v ⁻¹) de H ₂ SO ₄ , 10% de sólidos, 140°C, 150 rpm, 15 min e 1,5% de NaOH, 8% de sólidos, 150 rpm, 30 min	15	24	Batelada alimentada	127 g L ⁻¹ de glicose	(GODOY <i>et</i> <i>al.</i> , 2019)	
Bagaço de cana/15% (m m ⁻¹) de NaOH, 0,4% (m m ⁻¹) de HNQ, RLS 1: 9,7, 150°C, 60 min.	3	15	Batelada alimentada	122,66 g L ⁻¹ de ART	Este trabalho	
Bagaço de cana/15% (m m ⁻¹) de NaOH, 0,4% (m m ⁻¹) de HNQ, RLS 1: 9,7, 150°C, 60 min.	3	15	Batelada alimentada +aditivo (<i>Tween</i> 80)	141,95 g L ⁻¹ de ART	Este trabalho	

ART: açúcar redutor total; C_{enzima} : carga de enzimas; $C_{sólidos}$: carga final de sólidos

3.4- Fermentação do hidrolisado enzimático por diferentes espécies de leveduras

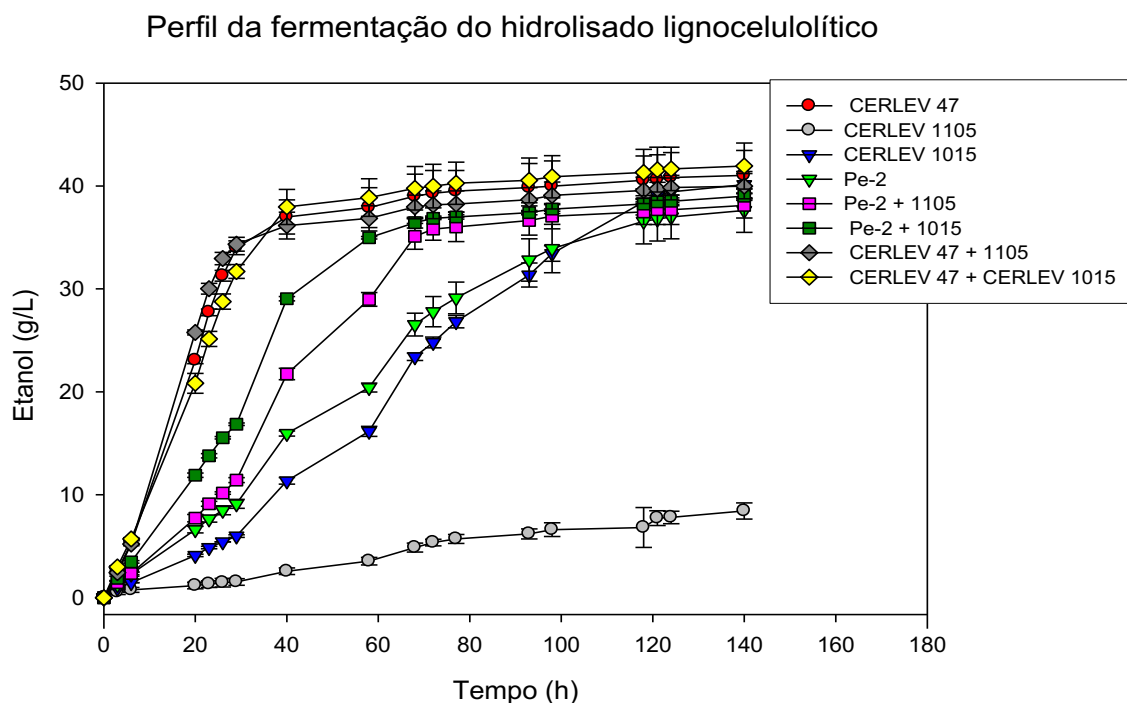
A hidrólise enzimática realizada em maior escala (volume final de 550 mL), com 3 FPU g⁻¹ durante 72 h, originou hidrolisado com a composição de 93,20 g L⁻¹ de glicose, 35,61 g L⁻¹ de xilose e 1,59 g L⁻¹ de arabinose. Este hidrolisado foi utilizado para fermentação e produção de etanol, utilizando diferentes espécies de leveduras isoladas ou em co-fermentação. A Tabela 7 apresenta a média dos resultados obtidos para os testes de fermentação com as diferentes espécies de leveduras, sendo as industriais *Saccharomyces cerevisiae* (CERLEV 47) e *Saccharomyces cerevisiae* (Pe-2) e as isoladas em alambiques de cachaça, *Wickerhamomyces anomalus* (CERLEV 1105) e *Pichia guilliermondii* (CERLEV 1015). As cepas industriais foram combinadas às selvagens, nos consórcios Pe-2/CERLEV 1105, Pe-2/CERLEV 1015; CERLEV 47/CERLEV 1105, CERLEV 47/CERLEV 1015.

Tabela 7: Produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático, utilizando diferentes espécies de leveduras.

Ensaio	Etanol / (g L ⁻¹)	Etanol / (% v v ⁻¹)	Produtividade em etanol / (g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CERLEV 47)	57,66 ± 0,56	7,31 ± 0,071	0,412 ± 0,004
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (CERLEV 1105)	3,72 ± 1,67	0,47 ± 0,211	0,027 ± 0,012
<i>Pichia guilliermondii</i> (CERLEV 1015)	56,48 ± 6,31	7,16 ± 0,799	0,40 ± 0,045
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Pe-2)	60,02 ± 5,51	7,61 ± 0,699	0,43 ± 0,039
Pe-2 + CERLEV 1105	58,92 ± 1,16	7,47 ± 0,146	0,42 ± 0,0082
Pe-2 + CERLEV 1015	59,58 ± 1,50	7,55 ± 0,190	0,43 ± 0,011
CERLEV 47 + CERLEV 1105	61,27 ± 0,94	7,77 ± 0,119	0,44 ± 0,007
CERLEV 47 + CERLEV 1015	59,97 ± 0,20	7,60 ± 0,025	0,43 ± 0,0014

Após 140 h de fermentação, a produção máxima de etanol foi de 61,27 g L⁻¹ pelo consórcio CERLEV 47/CERLEV 1105, porém de acordo com a análise de variância ($p < 0,05$), com exceção da CERLEV 1105, não houve diferença estatística entre a produção de etanol a partir dos ensaios de fermentação. Entretanto, conforme a análise da produção estimada de etanol apresentada (metodologia apresentada na seção 1.2.5), discreta diferença foi observada nas primeiras 40 h de fermentação, em que os cultivos CERLEV 1105, CERLEV 1015, Pe-2, Pe-2/CERLEV 1105 e Pe-2/CERLEV 1015 apresentaram metabolismo lento de açúcares, com a produção de etanol estimada em 2,76, 11,36, 15,95, 21,74 e 29,05 g L⁻¹, respectivamente. Em contrapartida, as combinações com a CERLEV 47 apresentaram rápido metabolismo e atingiram desaceleração da fermentação após 40 h, alcançando produtividade volumétrica (g L⁻¹ h⁻¹) de 0,925 para a espécie isolada e 0,904 e 0,949 para as combinações com CERLEV 1105 e CERLEV 1015, respectivamente (Figura 8).

Figura 8: Produção estimada de etanol utilizando duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e as espécies *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia guilliermondii* (fermentadoras de xilose).



Interessantemente, o consórcio entre as leveduras Pe-2/CERLEV 1015 apresentaram possível sinergismo no metabolismo de açúcares e produção de etanol, e atingiram o início da fase de desaceleração após 60 h de fermentação, aproximadamente 60 h a menos do que os ensaios com as espécies isoladas. Isso pode estar relacionado à fermentação de pentoses a etanol por CERLEV 1015 (*Pichia guilliermondii*). Martins *et al.* (2018) relataram rápido e eficiente consumo de xilose pela linhagem *Pichia guilliermondii* G1.2, que esgotou o açúcar em 48 h de ensaio, sendo 24 h a menos do que as cepas de *Candida tropicalis* FP, *C. tropicalis* S4.

Entretanto, mesmo que trabalhos anteriores tenham mostrado que a *Pichia guilliermondii* seja capaz de fermentar pentoses e hexoses a etanol (MARTINI *et al.*, 2016), a concentração final do álcool não excedeu os valores produzidos pelas espécies que não fermentam pentoses. Isso pode estar relacionado à repressão catabólica da glicose, fenômeno comum na maioria de microrganismos fermentadores. Esse processo leva à priorização da utilização de glicose sobre outras porções de açúcar presentes no

meio, resultando em inibição competitiva desses açúcares na presença de glicose, levando a um baixo rendimento volumétrico de etanol a partir de açúcares mistos presentes na biomassa lignocelulósica (AVANTHI *et al.*, 2017). Geralmente os sistemas de co-cultura operam em baixas concentrações de açúcares mistos ($<40 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $10\text{-}15 \text{ g L}^{-1}$ de xilose) devido à inibição dos derivados de glicose sobre os microrganismos que utilizam xilose (NGUYEN *et al.*, 2019).

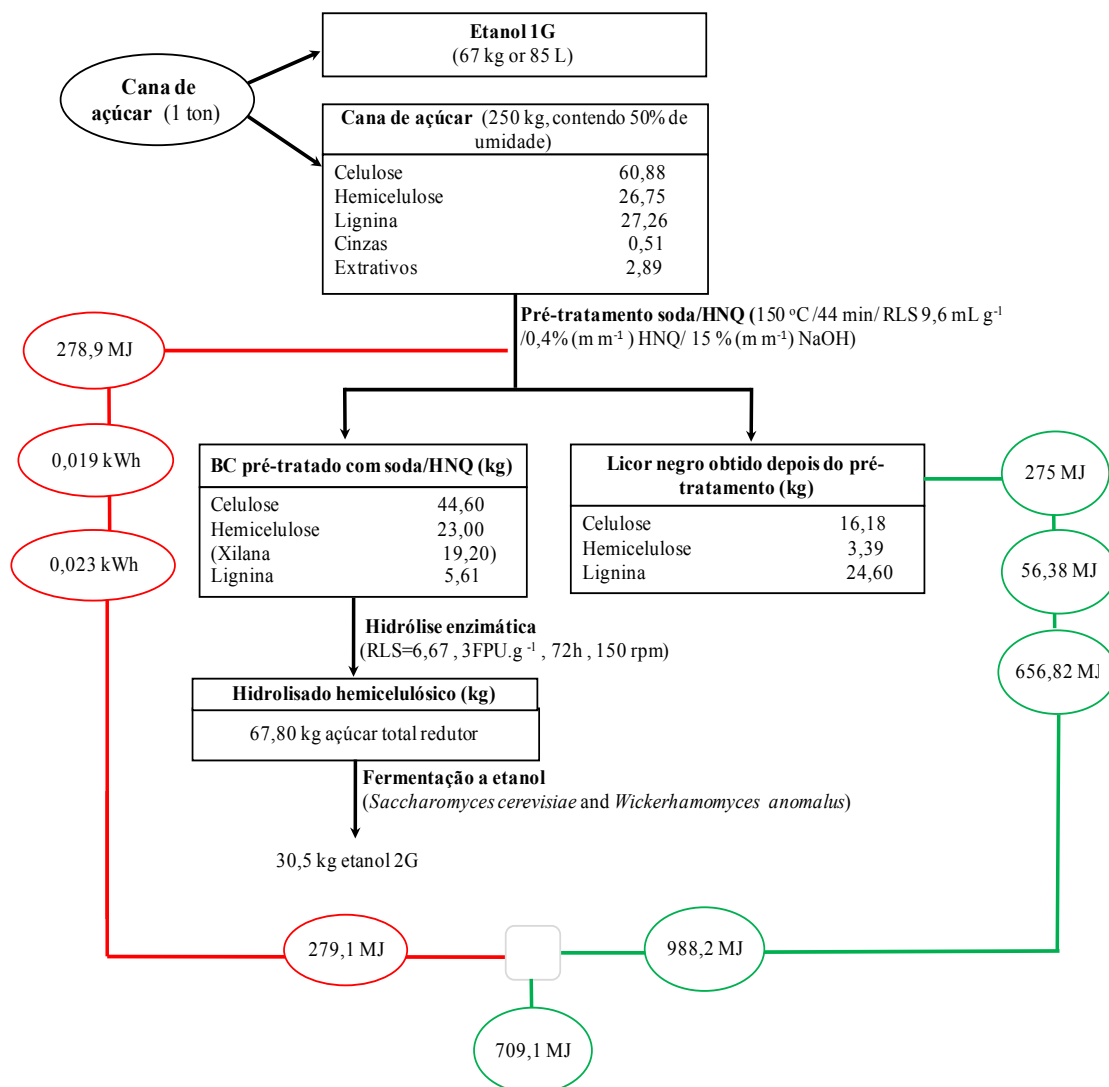
O hidrolisado enzimático foi fermentado por diferentes espécies de leveduras, tanto industriais quanto selvagens, com a máxima produção de 41,08 g de etanol para cada 100 g de bagaço de cana pré tratado soda/HNQ. Em trabalho semelhante, RABELO *et al.* (2013) realizaram hidrólise enzimática (20 % de sólidos, 50 FPU g^{-1}) de bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio e obtiveram apenas 14,6 g de etanol para cada 100 g bagaço, após fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*.

A reprodução dos ensaios de hidrólise enzimática, em maior escala, gerou licor com 135 g L^{-1} de ART, com produção máxima de $61,27 \text{ g L}^{-1}$ de etanol pelo consórcio CERLEV 47 e CERLEV 1105.

3.5- Processo global da produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana pré tratado soda/HNQ no cenário brasileiro

A partir da otimização das etapas da hidrólise enzimática, foi possível obter a produção máxima de $61,27 \text{ g L}^{-1}$ de etanol pelo consórcio CERLEV 47 e CERLEV 1105. O processo global estabelecido no presente estudo, indica que para cada tonelada de bagaço de cana *in natura*, possam ser produzidos 244 kg de etanol (ou 309 L). Atualmente o processamento de 1 tonelada de cana de açúcar pode gerar 85 L de etanol de etanol 1G (ou 67 kg) (SOUZA *et al.*, 2018) e 250 kg de bagaço de cana com 50% de umidade (GUSMÃO *et al.*, 2012) (Figura 9).

Figura 9: Rendimento do processo global da produção de etanol de segunda geração a partir do processamento de 1 tonelada de cana de açúcar durante a produção de etanol de primeira geração, estabelecido no presente trabalho. BC: Bagaço de cana



Considerando as informações anteriores e o processo de pré tratamento soda-HNQ, pode-se estimar a produção de 30,5 kg de etanol (ou 38,67 L) a partir de 125 kg de bagaço de cana em base seca. Dessa forma, pode-se concluir que a estabilização do processo aqui proposto permitirá aumentar em 45,5% a produção atual de etanol no Brasil, sem aumentar áreas de cultivos e gastos com insumos agrícolas. Ou seja, na safra 2018/2019 seria possível aumentar a produção de etanol em cerca de 15,08 bilhões de

litros. Considerando o total do subproduto gerado pela safra de 2018/2019, aplicado na produção de açúcar, a produção adicional total poderia chegar a 23,98 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2019).⁻¹

Além da produção de etanol, o fracionamento da biomassa por processo soda-HNQ, gerou considerável massa de lignina (196,62kg/ ton bagaço de cana), que pode ser utilizada para produção de energia a partir da queima em caldeiras. Considerando que a lignina pura apresenta valor calorífico de, cerca de 20,4 MJ / kg (KIM *et al.* , 2016), pode-se dizer que para 125 kg de bagaço de cana, pode-se obter produção de energia de 501,84 MJ, a partir da queima de 24,6 kg de lignina. Essa energia da lignina representa cerca de 26-27% da energia que pode ser produzido a partir da combustão do bagaço, considerando o valor obtido por Dias *et al.* (2011) que é cerca de 15,13 MJ/ kg. Rabelo *et al.* (2011) obtiveram produção de energia de 361,99 MJ e 329, 18 MJ pela queima da lignina recuperada por 125 kg de bagaço de cana pré tratado por peróxido de hidrogênio [7,36 % (v.v⁻¹) de H₂O₂; pH 11,5; 25 °C; 150 rpm; 1h.] e hidróxido de cálcio [47 % (m.m⁻¹) de Ca(OH)₂; 150 rpm; 90 °C; 90h] respectivamente.

Por tudo isso, o processo de pré tratamento soda-HNQ se mostra bastante vantajosa para melhorar a produção de etanol no país, uma vez que o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar (CONAB, 2018). Além disso, frente a crescente demanda mundial por etanol observada nos últimos anos, o estabelecimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis de segunda geração oferece a oportunidade de utilizar energias limpas e renováveis sem aumentar o cultivo da cana de açúcar.

4- Conclusões

A molécula de HNQ se mostrou igualmente eficaz para pré-tratamento em maior escala, em reator com rampa de aquecimento e sistema de recirculação do licor alcalino quanto para a utilização em menor escala com ausência da rampa de aquecimento.

O processo de otimização de hidrólise permitiu atingir o máximo da produção de açúcares redutores totais ($141,95 \text{ g L}^{-1}$), com baixa carga de enzimas (3 FPU g^{-1}) e elevado teor de sólidos (15%), por meio da utilização da estratégia de batelada alimentada e adição de *Tween* 80 aos ensaios. As conversões a glicose e xilose atingiram 94,2% e 79,1%, respectivamente

A fermentação resultou na máxima produção de etanol de $61,27 \text{ g L}^{-1}$ pelo consórcio CERLEV 47 + CERLEV 1015. Após 140 h de ensaio, não foi observada diferença entre concentrações de etanol produzidos pelas espécies de leveduras avaliadas. Esses resultados indicam que não foram produzidas concentrações significativas de inibidores de fermentação durante o pré-tratamento soda/HNQ, e que o hidrolisado enzimático pode ser fermentado tanto por espécies de leveduras industriais quanto selvagens. A eficiência global do processo estima que para cada tonelada de bagaço *in natura* sejam gerados 244 kg de etanol de segunda geração.

5- Referências bibliográficas

AGRAWAL, Ruchi; BHADANA, Bharti; MATHUR, A. S.; KUMAR, Ravindra; GUPTA, Ravi P.; SATLEWAL, Alok. Improved enzymatic hydrolysis of pilot scale pretreated rice straw at high total solids loading. *Frontiers in Energy Research*, v. 6, p.1-12, 2018;

ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4552–4558, 2011.

ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, 2011;

AVANTHI, Althuri; KUMAR, Sanjeev; SHERPA, Knawang Chhunji; BANERJEE, Rintu. Bioconversion of hemicelluloses of lignocellulosic biomass to ethanol: an attempt to utilize pentose sugars. *Biofuels*, v. 8, p. 431–444, 2017 ;

CARA, Cristóbal; MOYA, Manuel; BALLESTEROS, Ignacio; NEGRO, Maria José; GONZÁLEZ, Alberto; RUIZ, Encarnación. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1003–1009, 2007;

CHEN, Yumeng; WU, Chuan; FAN, Xingjia; ZHAO, Xinqing; ZHAO, Xihua; SHEN, Tao; WEI, Dongzhi; WANG, Wei. Engineering of *Trichoderma reesei* for enhanced degradation of lignocellulosic biomass by truncation of the cellulase activator ACE3. *Biotechnology for Biofuels*, v. 13, p. 1–14, 2020;

CINTRA, Lorena Cardoso; DA COSTA, Isabelle Cristine; DE OLIVEIRA, Izadora Cristina Moreira; FERNANDES, Amanda Gregorim; FARIA, Syd Pereira; JESUÍNO, Rosália Santos Amorim; RAVANAL, Maria Cristina; EYZAGUIRRE, Jaime; RAMOS, Luiz Pereira; DE FARIA, Fabrícia Paula; ULHOA, Cirano José. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 133, p. 109447, 2020;

CONAB. Produção de etanol no Brasil mantém recorde com 33,14 bilhões de litros. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>, acesso em dezembro de 2019;

CONAB. Cana-de- açúcar: Acompanhamento da safra brasileira 2018/2019 (primeiro levantamento). *Companhia Nacional de Abastecimento*, v. 5, p. 1–3, 2018.

CONCEIÇÃO, Luís Eduardo Fernandes Rodrigues da; SARAIVA, Margarete Alice Fontes; DINIZ, Raphael Hermano Santos; OLIVEIRA, Juliana; BARBOSA, Gustavo Dimas; ALVAREZ, Florencia; CORREA, Lygia Fátima da Mata; MEZADRI, Hygor; COUTRIM, Mauricio Xavier; AFONSO, Robson José de Cássia Franco; LUCAS, Candida; CASTRO, Ieso Miranda; BRANDÃO, Rogelio Lopes. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 42, p. 237–246, 2015.

DIAS, Marina O.S.; DA CUNHA, Marcelo Pereira; MACIEL FILHO, Rubens; BONOMI, Antonio; JESUS, Charles D.F.; ROSSELL, Carlos E.V. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: Comparison between different biomass pretreatment methods. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 955–966, 2011;

ERIKSSON, Torny; BÖRJESSON, Johan; TJERNELD, Folke. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 353–364, 2002;

GODOY, Carolina Marion De; MACHADO, Daniele Longo; COSTA, Aline Carvalho Da. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse – Assays and modeling. *Fuel*, v. 253, p. 392–399, 2019;

GOLDBECK, Rosana; GONÇALVES, Thiago A.; DAMÁSIO, André R.L.; BRENELLI, Livia B.; WOLF, Lúcia D.; PAIXÃO, Douglas A.A.; ROCHA, George J.M.; SQUINA, Fabio M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 131, p. 36–46, 2016;

GOMES, Absai da Conceição; MOYSÉS, Danuza Nogueira; SANTA ANNA, Lidia Maria Melo; CASTRO, Aline Machado de. Fed-batch strategies for saccharification of pilot- scale mild-acid and alkali pretreated sugarcane bagasse: Effects of solid loading and surfactant addition. *Industrial Crops and Products*, v. 119, p. 283–289, 2018;

GUSMÃO, Karla Aparecida Guimarães; GURGEL, Leandro Vinicius Alves; MELO, Tânia Márcia Sacramento; GIL, Laurent Frédéric. Application of succinylated sugarcane bagasse as adsorbent to remove methylene blue and gentian violet from aqueous solutions - Kinetic and equilibrium studies. *Dyes and Pigments*, v. 92, p. 967–974, 2012;

GUPTA, Rishi; KUMAR, Sanjay; GOMES, James; KUHAD, Ramesh Chander. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, p. 1–10, 2012.

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, Javier Ulises; HERNÁNDEZ-ESCOTO, Héctor. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings through fed-batch operation. *Biomass and Bioenergy*, v. 119, p. 191–197, 2018;

HUMBIRD, David; MOHAGHEGHI, Ali; DOWE, Nancy; SCHELL, Daniel J. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. *Biotechnology progress*, v. 26, p. 1245–1251, 2010;

JIMÉNEZ, L.; SERRANO, L.; RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ, R. Soda-anthraquinone pulping of palm oil empty fruit bunches and beating of the resulting pulp. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 3, p. 1262–1267, 2009;

JUNG, Young Hoon; PARK, Hyun Min; KIM, Dong Hyun; YANG, Jungwoo; KIM, Kyoung Heon. Fed-Batch Enzymatic Saccharification of High Solids Pretreated Lignocellulose for Obtaining High Titers and High Yields of Glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 182, p. 1108–1120, 2017.

KAAR, William E.; HOLTZAPPLE, Mark T. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, p. 419–427, 1998.

- KELBERT, Maikon; ROMANÍ, Aloia; COELHO, Eduardo; PEREIRA, Francisco B.; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Hydrothermal Pretreated Lignocellulosic Biomass: Evaluation of Process Performance Under Multiple Stress Conditions. *Bioenergy Research*, v. 9, p. 750–762, 2016.
- KIM, Daegi; LEE, Kwanyong; PARK, Ki Young. Upgrading the characteristics of biochar from cellulose, lignin, and xylan for solid biofuel production from biomass by hydrothermal carbonization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 42, p. 95–100, 2016;
- KIM, Hae-young. Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. *Rde- Restorative Density & Endodontics*, p. 74–77, 2014.
- KLING, S. H.; NETO, C. C.; FERRARA, M.A; TORRES, J. C. R; MAGALHÃES, D. B.; RYU, D. D. Y. Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse by Steam Explosion Pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 29, p. 1035-1039, 1987.
- LIMA, Diego Roberto Sousa; ADARME, Oscar Fernando Herrera; BAËTA, Bruno Eduardo Lobo; GURGEL, Leandro Vinícius Alves; DE AQUINO, Sérgio Francisco. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: A kinetic analysis. *Industrial Crops and Products*, v. 111, p. 684–693, 2018.
- LIU, Yunyun; XU, Jingliang; ZHANG, Yu; YUAN, Zhenhong; XIE, Jun. Optimization of high solids fed-batch saccharification of sugarcane bagasse based on system viscosity changes. *Journal of Biotechnology*, v. 211, p. 5–9, 2015.
- MARTINI, Cristina; TAU-K-TORNISIELO, Sâmia Maria; CODATO, Carolina Brito; BASTOS, Reinaldo Gaspar; CECCATO-ANTONINI, Sandra Regina. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, 2016.
- MARTINS, Gisele Marta; BOCCHINI-MARTINS, Daniela Alonso; BEZZERRA-BUSSOLI, Carolina; PAGNOCCA, Fernando Carlos; BOSCOLO, Maurício; MONTEIRO, Diego Alves; SILVA, Roberto da; GOMES, Eleni. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 162–168, 2018;
- ARIAS, Johanna Méndez; MORAES, Anelize de Oliveira; MODESTO, Luiz Felipe Amarante; DE CASTRO, Aline Machado; PEREIRA, Nei. Addition of Surfactants and Non-Hydrolytic Proteins and Their Influence on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 181, p. 593–603, 2017;
- MEYABADI, T. Fattahi; DADASHIAN, F. Optimization of enzymatic hydrolysis of waste cotton fibers for nanoparticles production using response surface methodology. *Fibers and Polymers*, v. 13, p. 313–321, 2012;
- MILLER, Lorens Gail. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426–428, 1959;

- MODENBACH, Alicia A.; NOKES, Sue E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. *Biomass and Bioenergy*. v. 56, p. 526-544, 2013;
- MURPHEY, W. K.; MASTERS, K. R. Gross heat of combustion of northern Red oak (*Quercus rubra* L.) chemical components. *Wood Science* v. 10, p. 139-141, 1978.
- NASCIMENTO, V. M.; NAKANISHI, S. C.; ROCHA, G. J.M.; RABELO, S. C.; PIMENTA, M. T.B.; ROSSELL, C. E.V. Effect of anthraquinone on alkaline pretreatment and enzymatic kinetics of sugarcane bagasse saccharification: Laboratory and pilot scale approach. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 4, p. 3609–3617, 2016.
- NGUYEN, Duong Thi Thuy; PRAVEEN, Prashant; LOH, Kai Chee. Co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Scheffersomyces stipitis* immobilized in polymeric membranes for fermentation of glucose and xylose to ethanol. *Biochemical Engineering Journal*, v. 145, p. 145–152, 2019;
- NÚÑEZ, N.; MARTÍN-ALFONSO, J. E.; EUGENIO, M. E.; VALENCIA, C.; DÍAZ, M. J.; FRANCO, J. M. Influence of *Eucalyptus globulus* kraft pulping severity on the rheological properties of gel-like cellulose pulp dispersions in castor oil. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 9777–9782, 2012;
- OKINO, Shohei; IKEO, Makoto; UENO, Yoshiki; TANEDA, Daisuke. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 535–539, 2013;
- PATEL, Harshvadan; DIVECHA, Jyoti; SHAH, Amita. Efficient Enzymatic Digestion of Alkali Treated Maize Stover Holocellulose by Developing Balanced Cocktail of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes. *Waste and Biomass Valorization*, v. 8, p. 1969–1979, 2017.
- PIPPO, W. Alonso; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. Alonsoamador Morales; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuel. Part 2: Socio-economic aspects and techno-economic analysis. *Waste and Biomass Valorization*, v. 2, p. 257–266, 2011;
- QING, Qing; WYMAN, Charles E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, p. 1–12, 2011;
- RABELO, S. C.; CARRERE, H.; FILHO, R Maciel.; COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 7887–7895, 2011;
- RABELO, Sarita C.; FILHO, Rubens Maciel; COSTA, Aline C. Lime pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, p. 1696–1712, 2013;
- ROCHA-MARTÍN, Javier; MARTINEZ-BERNAL, Claudio; PÉREZ-COBAS, Yolanda; REYES-SOSA, Francisco Manuel; GARCÍA, Bruno Díez. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 244, p. 48–56, 2017;

SILVA, Ayla Sant'Ana da; SOUZA, Marcella Fernandes de; BALLESTEROS, Ignacio; MANZANARES, Paloma; BALLESTEROS, Mercedes; BON, Elba P. S. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochemistry*, v. 51, p. 1561–1567, 2016;

SHEN, Jiacheng; AGBLEVOR, Foster A. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, n. 3, p. 241–250, 2008.

SOUZA, Alexandre; WATANABE, Marcos Djun Barbosa; CAVALETT, Otavio; UGAYA, Cassia Maria Lie; BONOMI, Antonio. Social life cycle assessment of first and second-generation ethanol production technologies in Brazil. *International Journal of Life Cycle Assessment*, v. 23, p. 617–628, 2018;

WANG, Wei; KANG, Li; WEI, Hui; ARORA, Rajeev; LEE, Y. Y. Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, p. 1139–1149, 2011;

XU, Chao; ZHANG, Jun; ZHANG, Yu; GUO, Ying; XU, Huijuan; XU, Jingliang; WANG, Zhongming. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. *Bioresource Technology*, v. 292, p. 1-7, 2019.

CAPÍTULO IV

Utilização de aditivos no extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e o efeito na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ

Utilização de aditivos no extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e o efeito na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ

1- Introdução

Um dos maiores problemas ao se utilizar enzimas para a hidrólise do bagaço é o seu elevado custo, o que torna o processo economicamente menos viável. Adicionalmente, o custo para a produção de enzimas ainda é muito alto e nesse processo, a matéria-prima se traduz em 40 a 60 % do custo de produção (GASSARA *et al.*, 2010). Todavia, a fermentação em estado sólido (SSF) tem sido apontada como o processo mais econômico para a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos, devido à vantagem de se utilizar resíduos agroindustriais como substratos para cultivo das espécies (BLANDINO *et al.*, 2002). Nesse cultivo, a matéria orgânica é usada como fonte de energia e de carbono para o crescimento, síntese da biomassa celular e de outros produtos do metabolismo microbiano, de modo que os resíduos sejam utilizados e produtos valiosos possam ser sintetizados (SILVA *et al.*, 2005)

Nesse contexto, os fungos tem sido a principal escolha na busca por novas espécies microbianas produtoras de enzimas lignocelulolíticas, principalmente porque possuem a capacidade de secretar as enzimas (CHANDEL *et al.*, 2015). Diversas espécies foram descritas em função do seu potencial biotecnológico, dentre elas vale mencionar *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma reesei* (VOHRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020)

Estudos anteriores mostraram a efetividade das enzimas produzidas pelo fungo, *Chrysosporthe cubensis* (CC), cultivado em farelo de trigo. Falkoski *et al.* (2013) cultivaram o fungo *C. cubensis* em farelo de trigo (estado sólido) e obtiveram altas atividades de endoglicanase (33,84 U g⁻¹), FPase (2,52 U g⁻¹), β-glicosidase (2155 U g⁻¹) e xilanase (362,38 U g⁻¹). A hidrólise do bagaço de cana pré-tratado alcalino e sacarificado com o extrato enzimático bruto, resultou na liberação de 320,8 mg de glicose e 288,7 mg de xilose por grama de biomassa. Por outro lado, os ensaios que utilizaram enzimas comerciais resultaram em apenas 250,6 mg de glicose e 62,1 mg de xilose por grama de biomassa.

Maitan-Alfenas *et al.* (2015) mostraram que o sucesso da hidrólise enzimática também depende do método de pré-tratamento, da matéria-prima e do coquetel enzimático utilizado. Neste estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com 1% (m v⁻¹) de H₂SO₄ ou 1% (m v⁻¹) de NaOH e a sacarificação da biomassa foi realizada com carga de 8 % de sólidos, utilizando 10 unidades de FPase g⁻¹ de bagaço. Os extratos enzimáticos testados foram do *C. cubensis* e três coquetéis comerciais para estudo comparativo. Os autores observaram que, em geral, as maiores liberações de glicose e

xilose foram oriundas do bagaço pré-tratado alcalino e sacarificado pelo *C. cubensis*, sendo de 5,32 g L⁻¹ e 9 g L⁻¹, respectivamente. Além disso, foi observado que as atividades específicas no coquetel do *C. cubensis* foram maiores quando comparadas aos coquetéis comerciais, Multifect[®] CL, Multifect[®] XL e Acelerase[®] 1500 (Dupont/Genencor International Inc., Rochester, NY, USA). Além disso, também foi constatada maior atividade da enzima lacase, quando comparado às misturas comerciais. As lacases auxiliam na remoção da lignina residual da biomassa lignocelulósica, bem como na oxidação de compostos fenólicos que inativam as enzimas celulase facilitando o acesso das celulases à fração de celulose. Além disso, como demonstrado por Ázar *et al.* (2018), a presença da lacase melhora a tolerância da xilanase em relação aos fenóis.

Visser *et al.* (2013) mostraram os sinergismos entre a mistura (50:50) dos extratos enzimáticos dos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum*. Foi observado que houve aumento de 76 % e 48 % nas atividades de FPases e endoglicanase, em relação ao valor teórico. Esta mistura dos coquetéis de enzimas, aplicado na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado alcalino, mostrou uma conversão de 60 % da glicana e 90 % da xilana.

Tendo em vista o potencial hidrolítico das enzimas do *C. cubensis*, especialmente na hidrólise das hemicelulases, o principal objetivo desse capítulo foi comparar sacarificação enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ utilizando o extrato enzimático bruto do *C. cubensis* e o coquetel comercial CellicCtec 2. Além disso, foi avaliado o efeito de quatro aditivos durante os ensaios de sacarificação, sendo soro albumina bovina, 2-hidróxi-1,4- naftoquinona, proteínas do soro de queijo e Tween 80.

2- Materiais e métodos

2.1- Materiais

Xilana Beechwood, ácido dinitrossalicílico (DNS), Batata dextrose ágar (BDA), Comassie Blue G-250 e 2-hidróxi-1,4 naftoquinona foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). O extrato de levedura foi obtido da Himedia Laboratories Co (Mumbai, Maharashtra, Índia). Os reagentes químicos NaOH e tartarato de sódio e potássio foram obtidos da Vetec Fine Chemical (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

A mistura de enzimas comerciais CellicCtec 2 foi gentilmente cedida pela Novozymes (Araucária, PR, Brazil), com atividade enzimática de aproximadamente 136 FPU mL⁻¹, como determinada pelo método padrão (Ghose, 1987).

O soro de queijo foi obtido dos Laticínios Viçosa pertencente à Universidade Federal de Viçosa, a partir do processo de produção do queijo Mozarela. O material obtido foi liofilizado para retirada da água e as proteínas totais foram quantificadas, conforme item 1.2.2.1.

2.2- Metodologia

2.2.1- Produção do extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis*

2.2.1.1 - Microrganismo

O *C. cubensis* LPF-1, utilizado neste estudo, foi obtido a partir da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Este fungo foi mantido em placas BDA a 28°C e periodicamente subcultivadas. O pré inóculo foi preparado por crescimento do fungo sob fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio com a seguinte composição, em g L⁻¹: glucose, 10,0; NH₄NO₃, 1,0; KH₂PO₄, 1,0; MgSO₄, 0,5 e extrato de levedura, 2,0. Cada frasco foi inoculado com 10 discos de ágar cortados em uma colônia de *C. cubensis* de 5 dias de idade, crescida em placas de BDA e incubadas em um agitador rotativo durante 5 dias, a 150 rpm e 28°C.

2.2.1.2- Produção de enzimas

Para a produção das enzimas por meio da fermentação em estado sólido (SSF) foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 12,5 g de farelo de trigo e 18,75 mL do meio de cultura (umidade final de 60 %) consistindo, em g/L: NH₄NO₃, 1,0; KH₂PO₄, 1,5; MgSO₄, 0,5; CuSO₄, 0,25 e extrato de levedura, 2,0. Além disso, MnCl₂ (0,1 mg/L), H₃BO₃ (0,075 mg/L), Na₂MoO₄ (0,02 mg/L), FeCl₃ (1,0 mg/L) e ZnSO₄ (3,5 mg/L) foram adicionados ao meio como oligoelementos. Os frascos foram autoclavados a 121°C durante 20 min e depois inoculados com 5 mL (contendo 1,5 × 10⁷ esporos mL⁻¹) do inóculo, obtido como mencionado no item 1.2.1.1.

Os frascos foram mantidos a 28 °C numa câmara de temperatura controlada e a extração das enzimas foi realizada após 7 dias de fermentação. As enzimas segregadas durante a fermentação em estado sólido foram extraídas e solubilizadas em tampão citrato de sódio, 0,05 mol L⁻¹, pH 5, numa proporção de 10:1 (tampão/substrato seco), com agitação de 150 rpm durante 60 min à temperatura ambiente. Os sólidos foram separados por filtração por meio de um tecido de nylon seguido de centrifugação a 15000 x g durante

10 min, e os sobrenadantes clarificados, chamados de extratos enzimáticos brutos, foram congelados e armazenados para posterior utilização nos ensaios de sacarificação do bagaço de cana.

2.2.2- Métodos analíticos

2.2.2.1- Análise de proteínas

O método descrito por Bradford (1976) com modificações foi utilizado para a determinação das concentrações proteicas no soro de queijo. O reagente de Bradford, concentrado 5 vezes, foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % ($v v^{-1}$) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % ($v v^{-1}$). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em papel de filtro. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250.

A concentração proteica foi determinada a partir do soro de queijo liofilizado e diluído em tampão citrato de sódio (50 mmol, pH 5). Ao tubo de reação foram adicionados 800 μ L de água destilada, contendo a solução do soro de queijo, e 200 μ L do reagente de Bradford. A mistura reacional foi agitada em vórtex e mantida por 15 min a temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram tomados a 595 nm e convertidos em concentração de proteínas a partir da construção de uma curva, utilizando BSA como padrão.

2.2.2.2- Ensaios enzimáticos

A atividade da enzima xilanase foi determinada usando xilana a partir de birchwood (1 % $m v^{-1}$) como substrato. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 100 μ L da solução de enzima diluída adequadamente e 400 μ L da solução de substrato de polissacarídeo diluída em tampão. As misturas reacionais foram incubadas durante 15 min e o teor total de açúcares redutores liberados foi determinado por meio do método DNS, utilizando xilose como padrão (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de xilose por minuto, de acordo com as condições padrão do ensaio

A determinação da Unidade de Papel Filtro (FPU), do extrato enzimático comercial (CellicCtec 2) foi determinado de acordo com procedimento padrão, utilizando papel Whatman nº 1 como substrato (Ghose, 1987).

2.2.2.3- Determinação dos açúcares redutores

A análise dos açúcares redutores, produzidos durante os ensaios de hidrólise enzimática, foi realizada pelo método espectrofotométrico usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A quantificação foi realizada por regressão linear de uma curva padrão de glicose (0,5-10 mg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em concentração de açúcar produzido, em g L⁻¹ e a conversão foi determinada conforme a equação 1.

$$\text{Conversão a ART / (g g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{ART}}{m_i} \quad (1)$$

sendo ART a massa (g) de açúcar redutor produzido durante a hidrólise e m_i a massa (g), em base seca, inicial do bagaço pré-tratado utilizado nos ensaios.

2.2.3- Preparação da mistura enzimática do coquetel comercial CellicCtec 2 e do extrato bruto do *Chrysosporthe cubensis*

Os ensaios para determinação da proporção ideal dos coquetéis apontaram que a mistura de 85 % CellicCtec 2 e 15 % CellicHtec 2 foi mais eficiente na hidrólise do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ. Foi verificado que nessa proporção do Htec (15%) a carga de xilanases era respectivamente 77,04 e 165,67 U mL⁻¹, nos ensaios que utilizaram 3 e 6,5 FPU g⁻¹. Posteriormente, a substituição do coquetel comercial pelo extrato de enzimas do *C. cubensis* (CC) foi realizada de acordo com as cargas de xilanases verificadas. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados conforme 1.2.3.1.

2.2.3.1- Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado soda-HNQ pela mistura CellicCtec 2 e *C. cubensis*

Os ensaios foram realizados com um grama de biomassa pré tratada para 10mL de solução contendo tampão citrato de sódio [pH 5; 0,05M, contendo 0,2 % (m v⁻¹) de azida de sódio]. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 25 mL em agitador orbital a 150 rpm a 50 °C. Foram avaliadas duas condições de carga de enzimas e tempo

de hidrólise, sendo 3 FPU g⁻¹, 72h e 6,5 FPU g⁻¹, 46h. Ao tubo controle foram adicionadas enzimas previamente desnaturadas por fervura a 5 min.

Após o tempo de ensaio, as reações foram paralisadas por fervura durante 5 minutos e o hidrolisado foi centrifugado a 3000 x g por 10 min para separar as frações líquida e sólida. A análise dos açúcares redutores, produzidos durante a reação, foram realizadas pelo método espectrofotométrico usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

2.2.3.2- Avaliação dos aditivos na hidrólise enzimática da mistura CellicCtec 2 e *C. cubensis*

Foi verificada que a utilização da condição 3 FPU g⁻¹, 72h, utilizando a mistura Ctec:CC apresentou pior desempenho do que a mistura comercial 85 Ctec:15 Htec, levantando duas hipóteses. A primeira hipótese está relacionada a uma possível adsorção improdutiva das enzimas catalíticas à lignina residual da biomassa. Como o ensaio utilizou baixa carga de enzimas (3 FPU g⁻¹), parte dessas enzimas estaria se ligando de forma inespecífica à lignina, restando menor quantidade de enzimas para atuar na celulose e hemicelulose. A segunda hipótese está relacionada ao maior tempo de hidrólise do ensaio (72h), que submeteu as enzimas a um maior período de agitação e alta temperatura. Dessa forma, para melhorar a efetividade do coquetel enzimático do CC, frente ao coquetel comercial CellicHtec 2, foram testados os aditivos: proteínas não catalíticas do soro de queijo e do BSA, para diminuir a adsorção à lignina residual; *Tween* 80, para melhorar a estabilidade das enzimas; e HNQ foi adicionado para verificar se esse mediador possui algum efeito positivo ou negativo nas atividades lignocelulolíticas. As concentrações utilizadas para cada aditivo foram: 0,1 % (v v⁻¹) de *Tween* 80 (OKINO *et al.*, 2013); 107 mg de proteínas não catalíticas para cada grama de lignina presente na biomassa (SOUZA, 2018); e 2% (m v⁻¹) do HNQ. Os aditivos foram avaliados separadamente ou em mistura, contendo as mesmas concentrações mencionadas anteriormente.

Como controle dos experimentos, foram realizados ensaios com a mistura comercial 85Ctec:15Htec e Ctec:CC, na ausência de aditivos. Os aditivos foram previamente incubados junto ao substrato a uma temperatura de 50 °C em agitador orbital a 150 rpm durante 1h. Os ensaios foram realizados com carga de enzimas de 3 FPU g⁻¹ durante 72 h. Após atingir o tempo de hidrólise, a reação foi paralisada por fervura

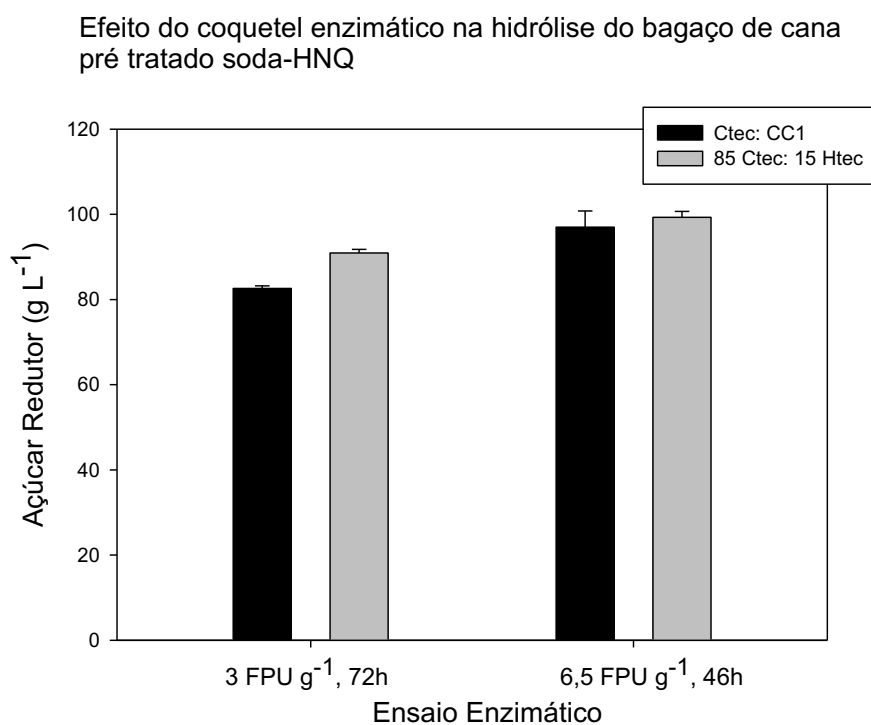
durante 5 min. O hidrolisado foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado e analisado, conforme citado 1.2.2.3.

3- Resultados e discussão

De acordo com os ensaios enzimáticos, são adicionados 77,04 e 165,67 U mL⁻¹ de xilanase, proveniente dos 15 % Htec 2 na mistura com 85 % do Ctec 2, nos ensaios com 3 e 6,5 FPU g⁻¹, respectivamente. A partir desses dados, foi realizada a substituição do coquetel comercial pelo extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* (CC), nas condições de 3 FPU g⁻¹, 72h e 6,5 FPU g⁻¹, 46h, com as respectivas cargas de xilanase de 77,04 e 165,67 U mL⁻¹.

A substituição do coquetel comercial (Htec) pelo extrato bruto do CC gerou hidrolisado com 82,58 e 96,98 g L⁻¹ de açúcares redutores totais (ART) nos ensaios com 3 FPU, 72h e 6,5 FPU, 46h, respectivamente. Em contrapartida, os ensaios realizados com a mistura de enzimas comerciais geraram 90,92 e 99,28 g L⁻¹, para os ensaios com 3 e 6,5 FPU g⁻¹, respectivamente (Figura 1).

Figura 1: Efeito dos coquetéis na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ.



Nos ensaios com 46 h (6,5 FPU g⁻¹), a mistura Ctec:CC gerou apenas 2,3 g L⁻¹ de ART a menos do que a mistura Ctec: Htec. Entretanto, nos ensaios de 72h (3 FPU g⁻¹) foi observada uma queda de 8 g L⁻¹ na produção de ART (Figura 1). Esses resultados podem indicar uma possível perda de atividade das enzimas do CC durante longos períodos de atividade, que pode ser atribuída à adsorção improdutiva das enzimas na lignina residual, pela destruição de componentes enzimáticos por agitação ou desnaturação por temperatura. Falkoski *et al.* (2013) verificaram que após 48h de incubação a 40 °C, as xilanases do *Chrysosporthe cubensis* mantém 92,30 % da atividade inicial e que esse valor diminui para 81,2 % quando a temperatura é elevada para 50 °C.

Dessa forma, na tentativa de estabilizar as enzimas fúngicas no ensaio de 72 h (3 FPU g⁻¹), foram avaliados quatro aditivos, sendo proteínas não catalíticas (proteínas do soro de queijo e soro albumina bovina), o HNQ e o surfactante *Tween* 80. Os dados mostraram pequena variação, sendo de - 0,67, +1,81 e +3,22 g L⁻¹, na concentração de ART produzido nos ensaios com BSA, soro de queijo e HNQ, respectivamente, quando comparados ao ensaio na ausência de aditivos (Tabela 1). Essas implicações indicam que nesses testes, os aditivos não influenciaram na produção de açúcares redutores, pois apresentaram valores próximos ao teste controle (Ctec : CC).

Tabela 1: Avaliação da utilização de diferentes aditivos no coquetel enzimático do *Chrysosporthe cubensis* durante a sacarificação de bagaço de cana pré tratado soda-HNQ utilizando 3 FPU g⁻¹, durante 72h

Tratamento	Açúcar redutor (g g ⁻¹)	Açúcar redutor (g L ⁻¹)
85 Ctec: 15 Htec (sem aditivo)	0,91 ± 0,011	90,92 ± 0,860
CC + Ctec (sem aditivo)	0,82 ± 0,012	82,58 ± 0,634
CC+ Ctec +BSA	0,86 ± 0,031	85,80 ± 0,091
CC + Ctec +soro de queijo	0,82 ± 0,015	81,91 ± 1,494
CC + Ctec + <i>Tween</i> 80	0,90 ± 0,014	90,40 ± 0,951
CC + Ctec +mistura de aditivos	0,74 ± 0,001	74,099 ± 0,001
CC + Ctec +HNQ	0,85 ± 0,014	84,39 ± 0,407

CC: *Chrysosporthe cubensis*; Htec: Coquetel enzimático comercial CellicHtec; Htec: Coquetel enzimático comercial CellicCtec; HNQ: 2-hidróxi-1,4- naftoquinona; BSA: soro albumina bovina.

Proteínas não catalíticas, como o BSA e as presentes no soro de queijo, tem sido utilizadas para evitar a ligação improdutiva das celulasas na lignina residual, pois se ligam aos sítios da macromolécula, deixando as enzimas livres para atuar no substrato (BRETHAUER *et al.*, 2011; SOUZA, 2018). Palonen *et al.* (2004) realizaram um estudo sobre o comportamento de adsorção da exoglicanase CBH I e da endoglicanase EG II, e constataram que, na presença de excesso de BSA, ambas as enzimas se ligam em menor

extensão à lignina enriquecida por celulase, e a quantidade de enzima livre em solução aumentou de 22 % para 49 %. Como observado nesse trabalho, a adição de proteínas não catalíticas não influenciou na produção de ART, indicando que possivelmente a perda da atividade não esteja relacionada à adsorção improdutivo, causada pela presença de lignina residual.

Por outro lado, a mistura dos quatro aditivos foi prejudicial para a hidrólise enzimática, pois apresentou significativa queda de aproximadamente 8 g L^{-1} em relação ao ensaio Ctec : CC sem aditivos (Tabela 1).

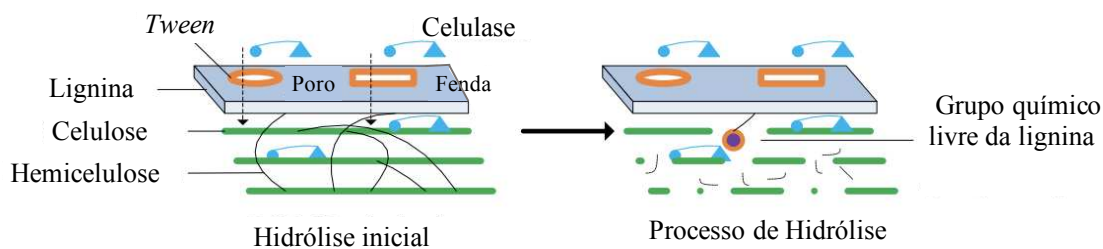
A adição de *Tween* 80 na reação foi benéfica para a atividade enzimática, pois apresentou hidrolisado com concentração de $90,40 \text{ g L}^{-1}$, sendo estatisticamente igual ao ensaio com a mistura de enzimas comerciais (85Ctec: 15Htec). Okino *et al.* (2013) verificou por SDS-PAGE, que a agitação da solução enzimática resultou na diminuição drástica da intensidade das bandas da CBH2 (celobio-hidrolase 2) porém, a adição do *Tween* 80 impediu esse resultado. Os autores concluíram que o *Tween* 80 atuou na estabilização dos componentes instáveis da celulase sob agitação. Por isso, acredita-se que esse surfactante possa atuar na estabilização das enzimas do extrato enzimático do *C. cubensis*.

Entretanto, mesmo que o mecanismo exato da interação surfactante-substrato-enzima não seja totalmente compreendido, dados sugerem que os surfactantes também atuem impedindo a adsorção não produtiva das enzima na lignina (CASTANON e WILKE, 1981; ALHAMMAD *et al.* 2018).

Zhang *et al.* (2019) observaram aumento de 70,2 para 77,6 % no rendimento de glicose, obtido após o pré-tratamento a 160° C por 60 min com 6,25 % de H_2O_2 e a adição de *Tween* 80. Segundo a pesquisa, o *Tween* 80 reduziu a adsorção das celulases na lignina por interações hidrofóbicas, e aumentou a dessorção das enzimas nas fibras do substrato, resultando na melhoria da eficiência enzimática.

Wang *et al.* (2018) apontaram que os *Tween* possuem duplo efeito durante a hidrólise enzimática. No primeiro efeito, reduzem a tensão superficial do sistema de reação e abrem um caminho (fendas e poros) mais conveniente para a acessibilidade da celulase à celulose. Com o processo de hidrólise, vários grupos químicos da lignina, que se conectaram com hemicelulose e celulose, ficam expostos e, por isso, podem participar da adsorção da celulase. Os *Tween* se combinariam com esses grupos químicos livres para impedir a adsorção da celulase à lignina, caracterizando o segundo efeito (Figura 2).

Figura 2: Mecanismo do duplo efeito dos Tweens durante a hidrólise enzimática, proposto por Wang *et al.* (2018)



Os surfactantes não iônicos, especialmente de polissorbato (*Tween*), têm sido cada vez mais utilizados na hidrólise enzimática da lignocelulose pré-tratada, devido aos seus baixos custos, fácil disponibilidade e pouco dano ao meio ambiente (ERIKSSON *et al.*, 2002). No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar como o *Tween* 80 atua sobre as enzimas lignocelulolíticas do fungo *C. cubensis*.

A utilização de um extrato enzimático bruto oferece a oportunidade de realizar a sacarificação de forma economicamente mais viável. Adicionalmente, como relatado anteriormente (FALKOSKI *et al.*, 2013 ; DUTRA *et al.*, 2017), o *C. cubensis* é capaz de sintetizar um rico arsenal de enzimas para a hidrólise, principalmente, das hemiceluloses, como as β -xilosidases e xilanases, além de enzimas acessórias, capazes de atuar nas cadeias laterais do polímero, como as α -galactosidases e α -arabinofuranosidases. Além disso, também foi relatado que o fungo *C. cubensis* é capaz de produzir a enzima lacase (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015), que oxida vários compostos fenólicos substituídos usando oxigênio molecular como aceptor de elétrons (ARIAS *et al.*, 2016). Por tudo isso, a utilização do referido coquetel, foi promissora frente ao coquetel comercial CellicHtec.

4- Conclusões do capítulo

O coquetel enzimático do *Chrysosporthe cubensis* se mostrou tão eficiente quanto o coquetel comercial CellicHtec na hidrólise do bagaço de cana pré tratado soda-HNQ, nos ensaios com 46 h de reação.

A adição do surfactante *Tween* 80 foi interessante nos ensaios com 72h de hidrólise, pois permitiu obter resultados tão satisfatórios quanto o ensaio com 46h. Acredita-se que o surfactante tenha atuado na estabilização das enzimas do coquetel do *Chrysosporthe cubensis*.

5- Referências bibliográficas

ALHAMMAD, A.; ADEWALE, P.; KUTTIRAJA, M.; CHRISTOPHER, L. P. Enhancing enzyme-aided production of fermentable sugars from poplar pulp in the presence of non-ionic surfactants. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 41, p. 1133–1142, 2018;

ARIAS, M. E.; BLÁNQUEZ, A.; HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; BALL, A. S.; JIMÉNEZ-MORILLO, N. T.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A. Role of a thermostable laccase produced by *Streptomyces ipomoeae* in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 122, p- 202-208, 2016;

ÁZAR, Rafaela I.S. Ladeira; MORGAN, Túlio; SANTOS, Antonio Carlos Freitas dos; XIMENES, Eduardo de Aquino; LADISCH, Michael R.; GUIMARÃES, Valéria M. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 109, p. 25-30, 2018.

BLANDINO, A.; IQBALSAYAH, T.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 2, p. 164– 169, 2002;

BRETHAUER, Simone; STUDER, Michael H.; YANG, Bin; WYMAN, Charles E. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6295–6298, 2011;

CASTANON, Marisi; WILKE, Charle R. Effects of the surfactant *Tween* 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p. 1365–1372, 1981.

CHANDEL, Anuj K; ALBARELLI, Juliana Q; SANTOS, Diego T; MEIRELES, M Angela A; SILVA, Silvio S. Nanotechnology and computational simulation for ushering the current status of biorefineries. *Energy Education Science and Technology Part A: Energy Science and Research*, v. 33, p. 2611–2630, 2015;

DUTRA, Thiago Rodrigues; GUIMARÃES, Valéria Monteze; VARELA, Ednilson Mascarenhas; FIALHO, Lílian Da Silva; MILAGRES, Adriane Maria Ferreira; FALKOSKI, Daniel Luciano; ZANUNCIO, José Cola; DE REZENDE, Sebastião Tavares. A *Chrysosporthe cubensis* enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency. *Scientific Reports*, v. 7, 2017;

ERIKSSON, Torny; BÖRJESSON, Johan; TJERNELD, Folke. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 353–364, 2002;

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M.N.; COUTO, A. A.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis* : A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 296–305, 2013;

GASSARA, Fatma; BRAR, Satinder K; TYAGI, R D; VERMA, M; SURAMPALLI, R Y. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 388–394, 2010.

GHOSE, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* v. 59, p. 257–268.

SOUZA, Maria Isabella Petra. Efeito da adição do soro de leite na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Ouro Preto, p. 1-60. 2018.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E.M.; ALFENAS, R.F.; NOGUEIRA, B.R. G.; CAMPOS, G. G.; MILAGRES, A. F.; VRIES, R.P.; GUIMARÃES, V. M. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails : A comparative study. *Bioresource Technology*, v. 192, p. 670–676, 2015;

MILLER, Lorens Gail. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426–428, 1959.

OKINO, Shohei; IKEO, Makoto; UENO, Yoshiki; TANEDA, Daisuke. Effects of *Tween* 80 on cellulase stability under agitated conditions. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 535–539, 2013;

PALONEN, Hetti; TJERNELD, Folke; ZACCHI, Guido; TENKANEN, Maija. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, v. 107, p. 65–72, 2004;

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira; GURGEL, Leandro Vinícius Alves; PASQUINI, Daniel; BADOTTI, Fernanda; GÓES-NETO, Aristóteles; BAFFI, Milla Alves. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683–2693, 2020;

SILVA, D; TOKUIOSHI, K; MARTINS, E da S; SILVA, R D; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2885–2889, 2005;

VISSER, E.M.; FALKOSKI, D.L.; de ALMEIDA, M. N.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; GUIMARÃES, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 587–594, 2013;

VOHRA, Mustafa; MANWAR, Jagdish; MANMODE, Rahul; PADGILWAR, Satish; PATIL, Sanjay. Bioethanol production: Feedstock and current Technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 573-584, 2014

WANG, Wen; ZHUANG, Xinshu; TAN, Xuesong; WANG, Qiong; CHEN, Xiaoyan; YU, Qiang; QI, Wei; WANG, Zhongming; YUAN, Zhenhong. Dual Effect of Nonionic Surfactants on Improving the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. *Energy and Fuels*, v. 32, p. 5951–5959, 2018;

ZHANG, Hongdan; HUANG, Shihang; WEI, Weiqi; ZHANG, Jiajie; XIE, Jun. Investigation of alkaline hydrogen peroxide pretreatment and *Tween* 80 to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, p. 1–9, 2019.

Conclusões gerais do trabalho

A utilização da 2-hidróxi-1,4-naftoquinona (HNQ) ao pré-tratamento alcalino foi mais eficiente do que a antraquinona (AQ), tanto na preservação dos carboidratos quanto na solubilização da lignina no bagaço de cana pré-tratado. Além disso, o HNQ promoveu maior preservação do grau de polimerização da celulose e não inibiu as enzimas durante a sacarificação, sendo o contrário observado após a utilização da antraquinona.

Os testes de otimização da hidrólise enzimática permitiram atingir altas concentrações de açúcares redutores totais utilizando carga de enzimas de apenas 3 FPU g⁻¹, mesmo em ensaio com elevado teor de sólidos. O hidrolisado obtido pela sacarificação do bagaço de cana foi fermentado pelas cepas CERLEV 47 e CERLEV 1105 e gerou a máxima produção de 61,27 g L⁻¹ de etanol.

A eficiência global do processo estimou a produção de 244 kg de etanol para cada tonelada de bagaço de cana *in natura* e por isso confirma as hipóteses de que os processos utilizados nesse trabalho, não geraram inibidores para os organismos fermentadores, indicando a viabilidade do pré tratamento soda-HNQ para a produção de etanol de segunda geração