

CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI
GABRIEL RUFINO DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA DESLIGNIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO
EXTRATO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO EM LACCASE OBTIDA A PARTIR DE
XYLARIA SP. VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

São Bernardo do Campo

2022

CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI
GABRIEL RUFINO DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA DESLIGNIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO
EXTRATO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO EM LACCASE OBTIDA A PARTIR DE
XYLARIA SP. VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Centro
Universitário FEI, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de Mestre
em Engenharia Química. Orientado pela Prof.^a
Dra. Andreia de Araújo Morandim Giannetti.

São Bernardo do Campo
2022

Rufino da Silva, Gabriel .

OTIMIZAÇÃO DA DESLIGNIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA
UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO ENRIQUECIDO EM
LACCASE OBTIDA A PARTIR DE XYLARIA SP. VISANDO A
PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO / Gabriel
Rufino da Silva. São Bernardo do Campo, 2022.

85 f. : il.

Dissertação - Centro Universitário FEI.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andreia de Araújo Morandim Giannetti.

1. Biocombustível. 2. Bioetanol. 3. Hidrólise enzimática. 4.
Deslignificação enzimática. I. de Araújo Morandim Giannetti, Andreia ,
orient. II. Título.

Elaborada pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da FEI com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aluno(a): Gabriel Rufino da Silva

Matrícula: 420305-5

Título do Trabalho: Otimização da deslignificação de bagaço de cana utilizando extrato enzimático enriquecido em laccase obtida a partir de XYLARIA SP. Visando a produção de bioetanol de segunda geração

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador(a): Prof^a Dr^a Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Data da realização da defesa: 07/10/2022

ORIGINAL ASSINADA

Avaliação da Banca Examinadora:

A banca se reuniu e considerou que o trabalho apresenta mérito e que o aluno está apto a receber o título de mestre.

A Banca Julgadora acima-assinada atribuiu ao aluno o seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Prof^a Dr^a Bruna Pratto

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Aprovação do Coordenador do Programa de Pós-graduação

Prof. Dr. Ricardo Belchior Torres

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. Aos meus pais Edson e Elizabeth por todo amor e carinho que recebi durante a elaboração do mesmo. À minha noiva Ana pelo respeito, companheirismo e carinho ao longo do projeto. Às minhas avós Aparecida e Severina que com muita fé acreditaram no meu trabalho e, aos meus irmãos Junior e Moises que sempre me apoiaram incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me capacitar e ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

Agradeço aos meus pais Edson e Elizabeth, que mesmo com todas as adversidades que a vida pode nos proporcionar durante todo o período deste projeto, estiveram ao meu lado com muito amor, carinho e confiança em Deus. Sou grato por todas as conversas de apoio que tivemos, grato pelo carinho, pela paciência, pelo amor e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Sem vocês na minha vida eu jamais conseguiria concretizar esse sonho.

Agradeço à minha noiva, Ana, que com muito amor e carinho sempre acreditou que eu pudesse realizar esse projeto. Como minha melhor amiga sempre escutou minhas dores e desabafos, mas com muita sabedoria sempre soube me impulsionar e mostrar que com dedicação esse trabalho sairia do papel e se tornaria realidade. Agradeço por abdicar dos finais de semana ou de viagens para estar sentada ao meu lado me apoiando e me ajudando a encontrar forças para chegar até o final.

Agradeço também aos meus sogros Samuel e Juliana, por estarem ao meu lado e, também, renunciar a momentos de descanso para estarem presentes na elaboração deste trabalho. Agradeço o carinho e por apostarem no meu sucesso incessantemente. Agradeço às minhas avós, Aparecida e Severina, que com muitas orações sinceras me ajudaram a ter fé e acreditar que seria possível entregar o projeto final. Agradeço pelas palavras simples, com pouco estudo, mas que tinham a força de um exército de pesquisadores me orientando.

Ao meu irmão Junior, sua esposa Vanessa e seus filhos Guilherme e Gabrielle, que sempre estiveram ao meu lado, dando forças e pedindo a Deus por mim em todas às suas orações. Sou muito grato também pelas palavras de carinho e preocupação ao longo deste período. Suas histórias de vida e maturidade foram combustível à parte no meu dia a dia. Ao meu irmão Moises e seus filhos Isabela e Lucas, que com suas brincadeiras puderam me ajudar a tirar um pouco do peso do projeto. Além da paciência e compreensão nos momentos ausentes durante a elaboração do trabalho.

Agradeço aos técnicos de laboratório, em especial ao Paulo e o Mario que sempre estiveram de portas abertas, com muita paciência e dedicação para ajudar, conversar e orientar no que fosse possível. Agradeço também a Simone e a Karina pela paciência e preocupação comigo na secretaria do laboratório.

Por fim, faço um agradecimento também muito especial à Prof.^a Dra. Andreia de Araújo Morandim Giannetti, minha orientadora, pela pessoa e profissional que é. Sou grato por toda a sua dedicação, que por vezes a fez deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. Sem sua orientação, apoio, paciência e confiança esse trabalho não teria sido concretizado.

RESUMO

Estudos envolvendo a produção de biocombustíveis de segunda geração têm crescido significativamente, principalmente os que estão relacionados a aplicação de novas rotas enzimáticas com o objetivo otimizar o processo de pré-tratamento do bagaço de cana com extrato enriquecido em lacase, sugerindo uma possível redução de custo de produção e mantendo altos níveis de rendimentos na obtenção do bioetanol. Assim, no presente trabalho, inicialmente foi realizado o processo de fermentação do fungo *Xylaria* sp. em meio específico para a produção de lacase (MPL) bem como a caracterização do bagaço de cana, material lignocelulósico utilizado. Após essa etapa, o bagaço de cana foi autoclavado em presença de água e submetido ao processo de deslignificação utilizando o extrato enzimático bruto obtido a partir de *Xylaria* sp., sendo otimizadas as condições de tratamento em termos de temperatura e tempo. Foi também avaliada a influência da utilização de diferentes mediadores (ABTS, siringaldazina, catequina, ácido ferúlico e, lignina hidrolisada) no aumento da eficiência no processo. A última etapa do projeto consistiu na realização da hidrólise enzimática utilizando CellicCTec2® seguida do processo de fermentação em presença de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de bioetanol. Dessa forma, durante a obtenção de lacase a partir do fungo *Xylaria* sp. verificou-se uma atividade enzimática do extrato bruto de $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ e, uma atividade específica de $0,01 \text{ U.mg}^{-1}$. Com relação a caracterização do bagaço de cana, verificou-se uma concentração de lignina total de $21,7 \pm 0,1 \%$ e, uma concentração de holocelulose, de $78,9 \pm 1,7 \%$. Após a obtenção do extrato enzimático e caracterização do bagaço, a realização do tratamento do mesmo com o extrato enzimático mostrou como condição ideal de tratamento a utilização de temperatura igual $24,8 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 dias, condição que levou a uma deslignificação de $20,7 \%$. A avaliação dos mediadores mostrou que a utilização de siringaldazina levou a um aumento de $31,2 \%$ de deslignificação. Por fim, resultados de hidrólise enzimática mostram uma concentração de açúcares fermentescíveis de 33 g.L^{-1} após 48 h. Já, com relação ao teor de etanol, verificou-se uma concentração de $11,3 \text{ g.L}^{-1}$ após 24 h horas de fermentação e um grau de complementação de $67,3 \%$.

Palavras-chave: Biocombustível. Bioetanol. Hidrólise enzimática. Deslignificação enzimática.

ABSTRACT

Studies involving the production of second-generation biofuels have grown significantly, especially those related to the application of new enzymatic routes with the aim of optimizing the process of pre-treatment of sugarcane bagasse with an extract enriched in laccase, suggesting a possible cost reduction of production, and maintaining high levels of yield in obtaining bioethanol. Thus, in the present work, the process of fermentation of the fungus *Xylaria* sp. in a specific medium to produce laccase (MPL) as well as the characterization of sugarcane bagasse, the lignocellulosic material used. After this step, the sugarcane bagasse was autoclaved in the presence of water and subjected to the delignification process using the crude enzymatic extract obtained from *Xylaria* sp., with optimized treatment conditions in terms of temperature and time. The influence of the use of different mediators (ABTS, syringaldazine, catechin, ferulic acid and hydrolyzed lignin) in increasing the efficiency of the process was also evaluated. The last stage of the project consisted of enzymatic hydrolysis using CellicCTec2® followed by the fermentation process in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* to produce bioethanol. Thus, while obtaining laccase from the fungus *Xylaria* sp. there was an enzymatic activity of the crude extract of 0,01 U.mL⁻¹ and a specific activity of 0,01 U.mg⁻¹. Regarding the characterization of sugarcane bagasse, there was a total lignin concentration of 21,7 ± 0,1 % and a holocellulose concentration of 78,9 ± 1,7 %. After obtaining the enzymatic extract and characterization of the bagasse, its treatment with the enzymatic extract showed the use of a temperature equal to 24.8 °C for 2 days as an ideal treatment condition, a condition that led to a delignification of 20,7 %. The evaluation of the mediators showed that the use of syringaldazine led to a 31,2 % increase in delignification. Finally, enzymatic hydrolysis results show a concentration of fermentable sugars of 33 g.L⁻¹ after 48 h. Regarding the ethanol content, a concentration of 11,3 g.L⁻¹ was verified after 24 hours of fermentation and a degree of complementation of 67,3 %.

Keywords: Biofuel. Bioethanol. Enzymatic hydrolysis. Enzymatic delignification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Rotas de produção de biocombustíveis, certificação e uso | 19 |
| Figura 2 – Esquema de produção dos diferentes tipos de biocombustíveis..... | 21 |
| Figura 3 – Reação envolvida na produção do bioetanol..... | 23 |
| Figura 4 – Reação envolvida na produção de biodiesel..... | 24 |
| Figura 5 – Biocombustíveis obtidos a partir de microalgas | 25 |
| Figura 6 – Maiores produtores de bioetanol (produção para 2023)..... | 27 |
| Figura 7 – Exemplificação de parte da estrutura polimérica da celulose | 30 |
| Figura 8 – Estruturas representativa de parte da hemicelulose | 30 |
| Figura 9 – Exemplificação da estrutura química da lignina..... | 31 |
| Figura 10 – Arranjo do material lignocelulósico antes e após pré-tratamento | 32 |
| Figura 11 – Obtenção do bioetanol de primeira e segunda gerações..... | 35 |
| Figura 12 – Despolimerização da lignina catalisada por lacase | 41 |
| Figura 13 – Despolimerização da lignina na presença de mediadores..... | 42 |
| Figura 14 – Reação de oxidação da siringaldazina | 48 |
| Figura 15 – Reação entre a proteína e o corante Coomassie brilliant blue..... | 48 |
| Figura 16 – Planejamento utilizado durante a otimização da deslignificação | 50 |
| Figura 17 – Reação entre os açúcares fermentescíveis e o DNS..... | 52 |
| Figura 18 – Fungo <i>Xylaria</i> sp..... | 59 |
| Figura 19 – Variação da absorbância em função do tempo de reação | 60 |
| Figura 20 – Comparação da composição do bagaço bruto e autoclavado..... | 61 |
| Figura 21 – Micrografias do bagaço bruto e autoclavado..... | 62 |
| Figura 22 – Diagrama de Pareto para a (%) de deslignificação | 64 |
| Figura 23 – Superfície de resposta e de contorno para a (%) de deslignificação | 65 |
| Figura 24 – Determinação da condição ideal de deslignificação..... | 66 |
| Figura 25 – Deslignificação X mediador e enzima comercial..... | 67 |
| Figura 26 – Micrografias do bagaço autoclavado e tratado | 68 |
| Figura 27 – Determinação do tempo ideal de hidrólise enzimática..... | 69 |
| Figura 28 – Grau de complementação do processo de fermentação..... | 70 |
| Figura 29 – Cromatograma e espectros de massas - fermentação..... | 71 |
| Figura 30 – Curva de calibração para quantificação de açúcares..... | 83 |

| | |
|---|----|
| Figura 31 – Curva de calibração para dosagem de proteínas | 84 |
| Figura 32 – Curva de calibração para quantificação de etanol..... | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação dos tipos de biocombustíveis, vantagens e desvantagens..... | 21 |
| Tabela 2 – Principais etapas de produção do etanol de primeira geração | 28 |
| Tabela 3 – Etapas fundamentais para produção de etanol 2G..... | 34 |
| Tabela 4 – Pré-tratamentos da biomassa | 36 |
| Tabela 5 – Grupos enzimáticos e respectiva atuação no substrato | 44 |
| Tabela 6 – Planejamento estatístico utilizado no tratamento de deslignificação | 49 |
| Tabela 6 – Planejamento estatístico utilizado no tratamento de deslignificação | 50 |
| Tabela 7 – Rampa de aquecimento utilizada durante as análises via CG..... | 53 |
| Tabela 8 – Caracterização do bagaço antes e após ao processo de autoclavagem | 61 |
| Tabela 9 – Caracterização do bagaço após cada etapa de deslignificação | 63 |
| Tabela 10 – Estimativa dos efeitos para a (%) deslignificação | 64 |
| Tabela 11 – Composição do material após tratamento na presença de mediadores..... | 68 |
| Tabela 12 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentação..... | 70 |
| Tabela 13 – Concentração de açúcares X tempo de hidrólise | 83 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|---|----|
| APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE A HIDRÓLISE | 83 |
| APÊNDICE B – DADOS REFERENTES A CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO..... | 84 |
| APÊNDICE C – DADOS REFERENTES AO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO | 85 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

| | |
|------|---|
| ABTS | Ácido 2,2 -Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonico) Sal Diamônio |
| MPL | Meio específico para obtenção de lacase |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| MS | Espectro de massas |
| BDA | Batata Dextrose Agar |
| DNS | Ácido dinitrosalicílico |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 | BIOCOMBUSTÍVEIS | 18 |
| 3.2 | OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS..... | 20 |
| 3.2.1 | Biocombustíveis de primeira Geração..... | 23 |
| 3.2.2 | Biocombustíveis de segunda Geração..... | 24 |
| 3.2.3 | Biocombustíveis de terceira Geração | 24 |
| 3.2.4 | Biocombustíveis de quarta Geração | 25 |
| 3.3 | BIOETANOL..... | 26 |
| 3.4 | BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO | 29 |
| 3.5 | PRÉ-TRATAMENTO | 35 |
| 3.5.1 | Pré-tratamento físico | 36 |
| 3.5.2 | Pré-tratamento químico | 37 |
| 3.5.3 | Pré-tratamento biológico..... | 39 |
| 3.5.3.1 | <i>Tratamento com lacase.....</i> | <i>40</i> |
| 3.6 | PROCESSOS DE HIDRÓLISE DE MATERIAIS CELULÓSICOS | 42 |
| 3.6.1 | Hidrólise Ácida | 42 |
| 3.6.2 | Hidrólise enzimática..... | 43 |
| 4 | MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS..... | 45 |
| 4.1 | MATERIAIS..... | 45 |
| 4.2 | EQUIPAMENTOS | 46 |
| 4.3 | METODOLOGIAS | 46 |
| 4.3.1 | Obtenção dos fungos..... | 46 |
| 4.3.2 | Produção da oxidoredutase lacase | 47 |
| 4.3.2.1 | <i>Determinação da atividade enzimática - método Siringaldazina.....</i> | <i>47</i> |
| 4.3.2.2 | <i>Determinação da concentração de proteínas - método Bradford.....</i> | <i>48</i> |
| 4.3.3 | Deslignificação enzimática..... | 49 |
| 4.3.4 | Mediadores..... | 50 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.3.5 | Hidrólise enzimática..... | 51 |
| 4.3.5.1 | <i>Determinação da concentração de açúcares fermentescíveis (DNS).....</i> | 51 |
| 4.3.5.2 | <i>Cálculo da conversão mássica da hidrólise.....</i> | 52 |
| 4.3.6 | Produção de bioetanol..... | 53 |
| 4.3.6.1 | <i>Quantificação do etanol produzido na fermentação.....</i> | 53 |
| 4.3.6.2 | <i>Cálculo do rendimento da fermentação.....</i> | 54 |
| 4.3.7 | Caracterizações do bagaço | 54 |
| 4.3.7.1 | <i>Preparo inicial da amostra</i> | 54 |
| 4.3.7.2 | <i>Teor de Umidade.....</i> | 55 |
| 4.3.7.3 | <i>Cinzas.....</i> | 55 |
| 4.3.7.4 | <i>Extrativos.....</i> | 55 |
| 4.3.7.5 | <i>Lignina Total.....</i> | 56 |
| 4.3.7.6 | <i>Holocelulose</i> | 57 |
| 4.3.7.7 | <i>Celulose.....</i> | 57 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 59 |
| 5.1 | OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO..... | 59 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA | 60 |
| 5.3 | PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO ENZIMÁTICO | 62 |
| 5.4 | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DESLIGNIFICADO | 69 |
| 5.5 | PROCESSO DE FERMENTAÇÃO | 70 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 72 |
| | REFERÊNCIAS | 73 |
| | APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE A HIDRÓLISE | 83 |
| | APÊNDICE B – DADOS REFERENTES A CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO..... | 84 |
| | APÊNDICE C – DADOS REFERENTES AO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO | 85 |

1 INTRODUÇÃO

A utilização de biocombustíveis tem crescido expressivamente, bem como os estudos que buscam novas alternativas para suprir a matriz energética no país. Porém, verifica-se de maneira mais intensa, no setor de transporte, estudos relativos às novas alternativas de biocombustíveis que possam substituir os combustíveis derivados do petróleo como o diesel e a gasolina (THANIGAIVEL et al., 2022; LIN; LU, 2021). Neste contexto, a utilização de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, palha de milho, resíduos de indústria de papel e celulose, entre outros tem sido foco de várias pesquisas que visam o aumento da produtividade de biocombustíveis como, por exemplo, para produção de bioetanol e biodiesel.

Destes, o bioetanol tem sido muito estudado no Brasil e no mundo visando o desenvolvimento de novos processos de produção, principalmente a partir de resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos se mostram uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, uma vez que possibilita o reaproveitamento da biomassa bem como a redução da competição com o setor de alimentos (REYES et al., 2022; BALA; SINGH, 2019). Porém, para a produção de bioetanol de segunda geração existe a necessidade da realização de pré-tratamentos cujo principal objetivo é remover ou modificar as ligações entre a lignina e a hemicelulose presentes no material lignocelulósico promovendo, de forma eficiente a deslignificação, necessária para a realização de uma hidrólise que leve a uma boa conversão a açúcares fermentescíveis. Essas etapas podem ocorrer por vias química ou enzimática, porém, levando-se em consideração o desenvolvimento de processos cada vez mais sustentáveis, os processos enzimáticos têm ganhado mais visibilidade nos últimos anos. Esse apelo se deve a possibilidade de redução de resíduos bem como maior conversão na etapa de fermentação, que muitas vezes acaba apresentando menor rendimento devido na etapa de pré-tratamento (SAINI et al., 2020).

Neste cenário, a utilização de enzimas da classe das oxidoredutases, como as lacases, na etapa de pré-tratamento do material tem levado a resultados significativos de deslignificação (RAJESWARI; JACOB, 2020; SAINI et al., 2020). Dessa forma, justifica-se o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que o mesmo teve como objetivo a aplicação de extratos enzimáticos enriquecidos em lacase no processo de deslignificação de bagaço de cana bem como a realização da hidrólise enzimática utilizando celulase comercial. Salienta-se que o extrato enzimático foi obtido a partir de fungos associados a folhas de mandioca, o que

sugere uma possível redução de custo, principal problema apresentado para a substituição das rotas químicas por rotas enzimáticas.

2 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a aplicação microrganismos na obtenção de diversos bioprodutos como, por exemplo, enzimas, o presente trabalho apresentou os objetivos geral e específicos descritos nos itens 2.1 e 2.2.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a otimização do processo de pré-tratamento enzimático do bagaço de cana com extrato enriquecido em lacase obtida a partir do fungo *Xylaria* sp, visando a posterior hidrólise e obtenção de bioetanol de segunda geração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em consideração o objetivo geral do trabalho, destacam-se como objetivos específicos:

- Obtenção de extratos enzimáticos enriquecidos em lacase a partir do fungo *Xylaria* sp., obtido a partir de folhas de mandioca.
- Realização do tratamento do bagaço de cana com o extrato enriquecido em lacase e avaliação da eficiência no processo de deslignificação.
- Otimização do processo de tratamento enzimático do bagaço visando à deslignificação.
- Caracterização do bagaço deslignificado e avaliação da eficiência do processo.
- Realização da hidrólise enzimática do bagaço de cana deslignificado.
- Caracterização do hidrolisado obtido.
- Produção de bioetanol de segunda geração.
- Caracterização do biocombustível obtido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente muitos estudos estão sendo realizados buscando um desenvolvimento sustentável sendo necessário, para isso, a realização de pesquisas que busquem novas alternativas para geração de energia. Esses estudos têm como objetivo auxiliar na redução de emissão de gases do efeito estufa, principalmente no setor de transporte, responsável por aproximadamente 24 % das emissões. Neste cenário, a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis como, por exemplo, o bioetanol se torna necessária (ILIC; ÖDLUND, 2022).

Dessa forma, nesta seção são apresentados os principais conceitos necessários para a compreensão do presente trabalho que visou a produção de bioetanol de segunda geração a partir de bagaço de cana submetido aos processos de deslignificação e hidrólise enzimáticos.

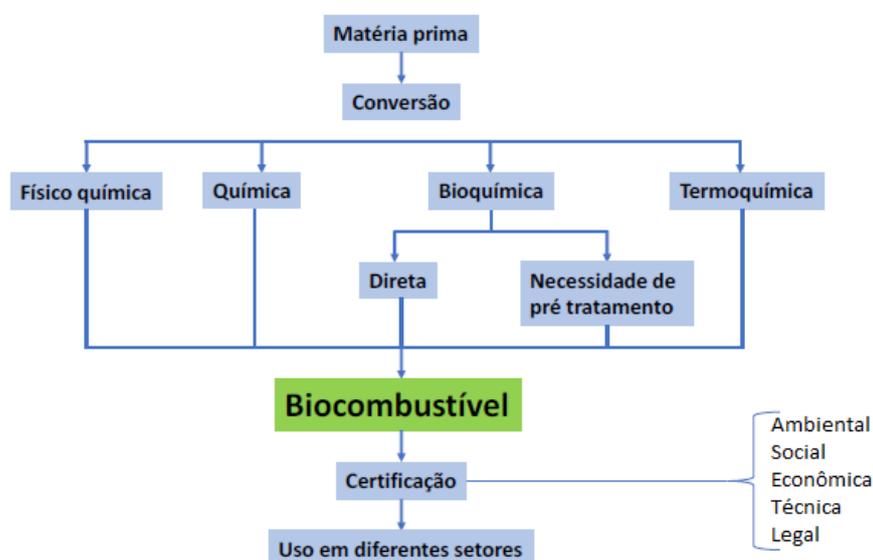
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Levando-se em consideração a necessidade de independência e eficiência energética, que são atributos fundamentais para o progresso socioeconômico mundial bem como o aumento significativo do número de veículos, surgem os combustíveis renováveis ou biocombustíveis como uma possível solução para suprir a demanda energética do setor bem como redução dos problemas ambientais. Neste contexto, os biocombustíveis têm sido estudados como uma alternativa de substituição ao petróleo e estão sendo incorporados na matriz energética com objetivo de reduzir a emissão de poluentes ao meio ambiente, buscando maior viabilidade econômica e sustentabilidade (ZABERMAWI et al, 2022; YUAN et al., 2021; SHANMUGAM et al., 2018; KACEM et al., 2016).

Devido as suas características, esses biocombustíveis têm despertado o interesse de pesquisadores e de produtores nos últimos anos devido as inúmeras possibilidades de obtenção, o que leva a uma matriz inesgotável, renovável e, sustentável (KRISHNAN et al., 2022). Eles são obtidos a partir da biomassa, isto é, uma fonte de energia renovável a qual utiliza fontes naturais, tais como compostos de origem animal (gorduras não comestíveis e resíduos de oleaginosas) e vegetal (resíduos amiláceos, materiais e resíduos lignocelulósicos, óleos vegetais, etc) no processo de produção. Neste contexto, as principais fontes de biomassa empregadas ou em estudo são cana-de-açúcar, milho, soja, semente de girassol, madeira, celulose, algas e microalgas, entre outras (KARIMI-MALEH et al., 2022; AMBAYE et al., 2021; M'BAREK et al., 2020).

Também deve ser levado em consideração a maior sustentabilidade verificada durante a produção de biocombustíveis desde o recebimento da matéria prima até o processo de queima do produto, o biocombustível. Várias pesquisas destacam o fato do consumo de CO₂ gerado durante a queima dos biocombustíveis durante a etapa de crescimento das plantas, o que favorece o fechamento do ciclo de carbono e redução do efeito estufa. Dessa forma, pode ser atribuído aos biocombustíveis a geração de um balanço econômico sustentável no país, o que justifica ainda mais o desenvolvimento de pesquisas para o aumento da produtividade, principalmente de biodiesel e bioetanol (Figura 1) (LEE et al., 2022; JIN et al., 2020; DA PETROBRAS, 2007).

Figura 1 – Rotas de produção de biocombustíveis, certificação e uso



Fonte: Autor "Adaptado de" Lin; Lu, 2021

Como exemplo de processo com sustentabilidade econômica destaca-se a substituição de veículos movidos a diesel por movidos a biodiesel, uma vez que, a produção desse biocombustível pode gerar uma balança comercial favorável levando-se em consideração todo o processo de produção e distribuição. Destaca-se também a geração de vários empregos durante todas as etapas envolvidas desde a obtenção da matéria prima até a distribuição do produto, o que favorece o desenvolvimento econômico do país (DA PETROBRAS, 2007).

É importante ressaltar nesse cenário, a utilização de bioetanol como uma alternativa promissora para substituição da gasolina devido a sua alta octanagem, calor de vaporização, eficiência de combustão 15 % superior à da gasolina (que leva a redução de emissão de

partículas e poluentes ao meio ambiente), teores de enxofre insignificantes e, fácil adaptação para os motores, principalmente no Brasil, o que pode levar a um aumento da demanda bem como a geração de uma forte economia no setor (SHERPA; GHANGREKAR; BANERJEE, 2018).

Deve-se levar em consideração também que, pelo fato de serem produzidos a partir de fontes renováveis, a produção de biocombustíveis pode ser controlada de acordo com a oferta e a demanda do setor, principalmente no que diz respeito à disponibilidade de matéria prima, uma vez que se torna possível a mudança da fonte de produção em função do cultivo e disponibilidade. Assim, os biocombustíveis mostram ser capazes de apresentar competitividade econômica frente aos combustíveis fósseis, os quais se encontram, em sua maioria, em regiões restritas ou de difícil acesso, o que leva a tendência de alta nos preços de acordo com a demanda do mercado (RAJAK; BANERJEE, 2018; SHANMUGAM et al., 2018).

Dessa forma, os biocombustíveis são considerados as maiores fontes de energia renovável atendendo aproximadamente 10% da demanda mundial de energia sendo considerados, portanto, a espinha dorsal da tecnologia de energia limpa devido à sua derivação de alimentos cultivados, culturas energéticas e, resíduos agroindustriais (SHANMUGAM et al., 2018).

3.2 OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Levando-se em consideração a obtenção dos biocombustíveis, em relação a matéria prima utilizada para a produção, os mesmos podem ser classificados em primários e secundários. Os primários são utilizados diretamente em processos de aquecimento e cozimento como, por exemplo, o carvão. Esses biocombustíveis possuem baixa eficiência energética e geram diversos compostos poluentes, o que desfavorece o seu uso. Já, os secundários, são produzidos a partir do processamento da matéria prima, levando a produção de biocombustíveis sustentáveis que podem ser classificados em primeira, segunda, terceira e, quarta geração (KARIMI-MALEH et al., 2022).

Dos biocombustíveis secundários, merecem destaque o bioetanol, biobutanol, biogás, biohidrogênio e, biodiesel, considerados os principais biocombustíveis biodegradáveis. Esses biocombustíveis levam a baixa emissão de poluentes ao meio ambiente e maior sustentabilidade, diferentemente dos combustíveis fósseis. Assim, os biocombustíveis podem

levar a redução dos impactos ambientais com o aumento da demanda de aplicação nos mais diversos setores (SUMAN et al., 2022; THAKUR et al., 2022).

Os biocombustíveis secundários podem ser produzidos por rotas termoquímicas, físico-químicas, químicas ou, bioquímicas e, devido as inúmeras possibilidades de produção e aplicabilidade, eles têm sido considerados como alternativa para substituir, com sucesso, os combustíveis fósseis e favorecer a redução de emissão de gases do efeito estufa (ZABERMAWI et al, 2022; ABBASI; PISHVAEE; MOHSENI, 2021). Levando em consideração a produção dos biocombustíveis secundários, eles são classificados, levando em consideração a matéria prima utilizada ou modificações no processo de produção em biocombustíveis de primeira, segunda, terceira ou quarta geração (Tabela 1) (SAWARKAR et al., 2022; MAHAPATRA et al., 2021).

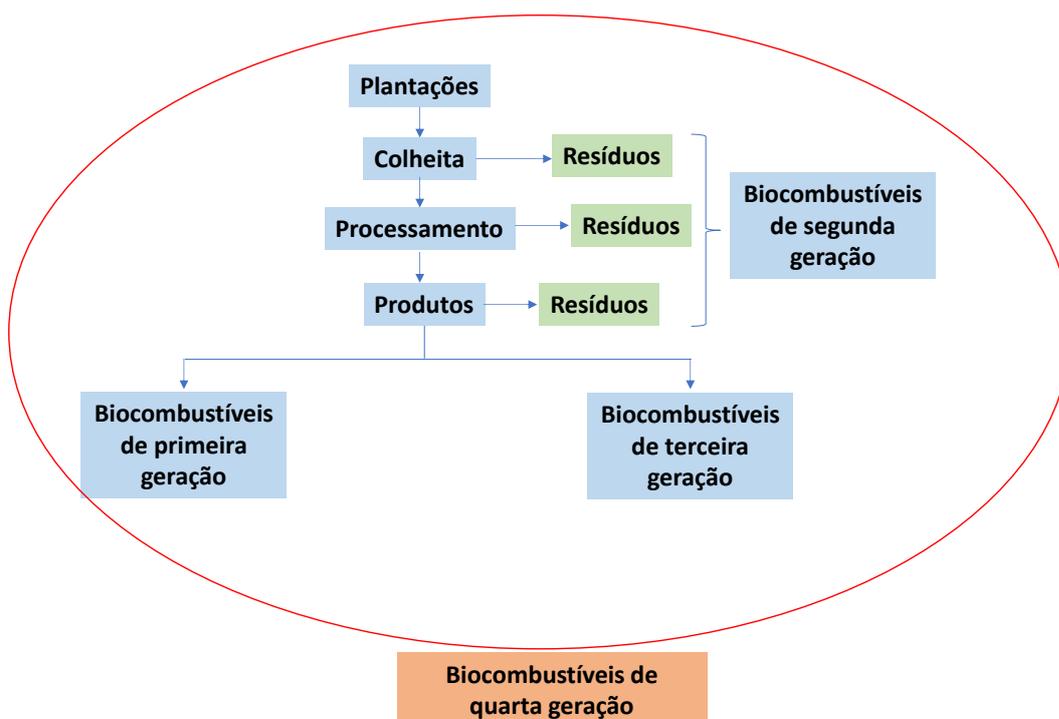
Tabela 1 – Classificação dos tipos de biocombustíveis, vantagens e desvantagens

| Geração | Matéria-Prima | Vantagem | Desvantagem |
|---------|---|---|---|
| 1ª | Oleaginosas, cana-de-açúcar e outros alimentos | Baixo custo e tecnologia já desenvolvida | Devido a competição com o setor alimentício, leva ao aumento do preço de alimentos. |
| 2ª | Biomassa Lignocelulósica: Resíduos agrícolas e florestais de baixo custo | Não compete com a alimentação | Aumento do custo do processo devido a necessidade da etapa de deslignificação. |
| 3ª | Algas | Não necessita de grandes áreas para o cultivo, não gera competição com o setor de alimentos e, apresentam ciclos de crescimento relativamente rápidos | Maior consumo de energia para o cultivo e processamento da matéria prima |
| 4ª | Plantas e algas geneticamente modificadas, microrganismos geneticamente modificados | Maior rendimento durante o processo e redução das emissões de gases do efeito estufa. | Maior custo do fotobioreator ou de produção |

Fonte: Autor “adaptado de” Silva, 2019

Dessa forma, na figura 2 é possível verificar, de forma resumida, um esquema de produção dos diferentes tipos de biocombustíveis bem como as etapas envolvidas na obtenção de cada geração de combustível destacando-se, principalmente, as rotas de produção de bioetanol, biodiesel, entre outros (ZABERMAWI et al, 2022).

Figura 2 – Esquema de produção dos diferentes tipos de biocombustíveis



Fonte: Autor “adaptado de” Zabemawi et al, 2022

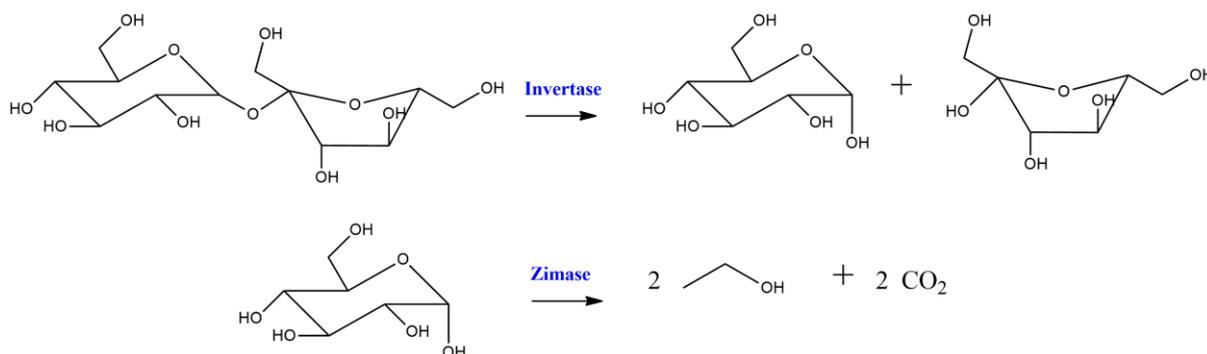
Destes, os biocombustíveis de primeira geração são os mais produzidos e utilizados atualmente, porém, devido ao fato de serem obtidos a partir de recursos utilizados no setor de alimentos como óleo de girassol, óleo de soja, amido, milho e, cana de açúcar, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de se utilizar de modo eficiente outros recursos que não gerem essa competição. Como exemplo, destaca-se o aumento da produção de biocombustíveis de segunda geração, obtidos a partir de biomassa proveniente de processos agroindustriais. Porém, para expansão dessa classe de biocombustíveis, existe a necessidade de pesquisas relacionadas ao armazenamento da biomassa, avaliação do ciclo de vida do biocombustível bem como gerenciamento de distribuição e riscos de produção (LEE et al., 2022; ZABERMAWI et al, 2022; ABBASI; PISHVAEE; MOHSENI, 2021).

A produção de biocombustíveis de terceira geração utiliza como matéria prima macroalgas e microalgas, o que leva a um novo cenário com maior sustentabilidade, porém, com vários desafios para aumento de produção e redução dos custos do processo devido a otimização de produção dessas espécies, principalmente em termos de cultivo e reaproveitamento da biomassa, o que pode gerar um cenário econômico desfavorável. Esses problemas podem ser reduzidos através da produção de biocombustíveis de quarta geração, em que são utilizados microrganismos geneticamente modificados bem como plantas geneticamente modificadas (ABBASI; PISHVAEE; MOHSENI, 2021).

3.2.1 Biocombustíveis de primeira Geração

Para a produção dos biocombustíveis de primeira geração são utilizadas matérias primas com elevados teores de açúcares (cana de açúcar e beterraba) ou amido (milho, sorgo doce, trigo, batata e, cevada) para produção de bioetanol pelo processo de fermentação (Figura 3) ou, óleos vegetais comestíveis para produção de biodiesel pelo processo de transesterificação (Figura 4) (LEE ET AL., 2022; LIN; LU, 2021; ALALWANA; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

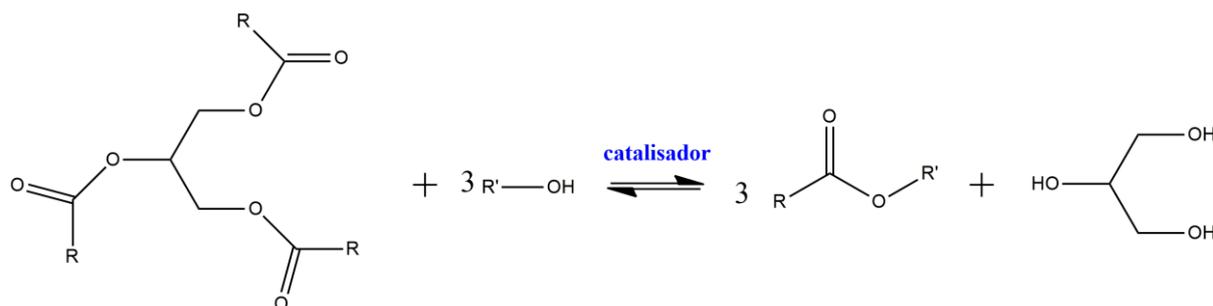
Figura 3 – Reação envolvida na produção do bioetanol



Fonte: Autor

Porém, pelo fato de serem produzidos a partir de recursos alimentares como os destinados a produção de alimentícios ou de rações, acabam levando a um desbalanço econômico devido a competição direta com o setor de alimentação, tanto em termos de terra como devido ao desvio para a produção de combustível. Também em deve ser levado em consideração que, na maioria das vezes, o processo consiste na produção do biocombustível e descarte dos resíduos, que poderiam levar a um aumento da produção, como ocorre no caso da obtenção dos combustíveis de segunda geração. Por outro lado, uma vantagem desse processo é o baixo custo do processo, considerado relativamente simples, bem como o vasto conhecimento da tecnologia envolvida que é considerada totalmente consolidada (LEE et al., 2022; AGHAEI et al., 2022; MAHAPATRA et al., 2021; LIN; LU, 2021).

Figura 4 – Reação envolvida na produção de biodiesel



Fonte: Autor

3.2.2 Biocombustíveis de segunda Geração

Os biocombustíveis de segunda geração são combustíveis obtidos a partir materiais lignocelulósicos, resíduos agrícolas, resíduos florestais, outros produtos residuais e, fontes oleaginosas não comestíveis como pinhão manso, óleo de mamona, entre outros. A utilização dessas matrizes leva a uma quantidade de matérias primas significativamente elevada para aplicação no processo de produção tanto de bioetanol, como de biodiesel (SAWARKAR et al., 2022; MAHAPATRA et al., 2021). Os mesmos podem ser obtidos a partir de rotas termoquímicas como gaseificação, pirólise ou torrefação ou por rotas de transesterificação e fermentação (LIN; LU, 2021; ALALWANA; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Durante o processo de produção de biocombustíveis de segunda geração, verifica-se que não existe competitividade com os recursos alimentares utilizados para produção dos de primeira geração. Porém, verifica-se aumento no custo do processo devido a necessidade de um número maior de etapas para reaproveitamento da biomassa ou para o preparo da biomassa para ser utilizada na produção do biocombustível (LEE et al., 2022; ZABERMAWI et al, 2022).

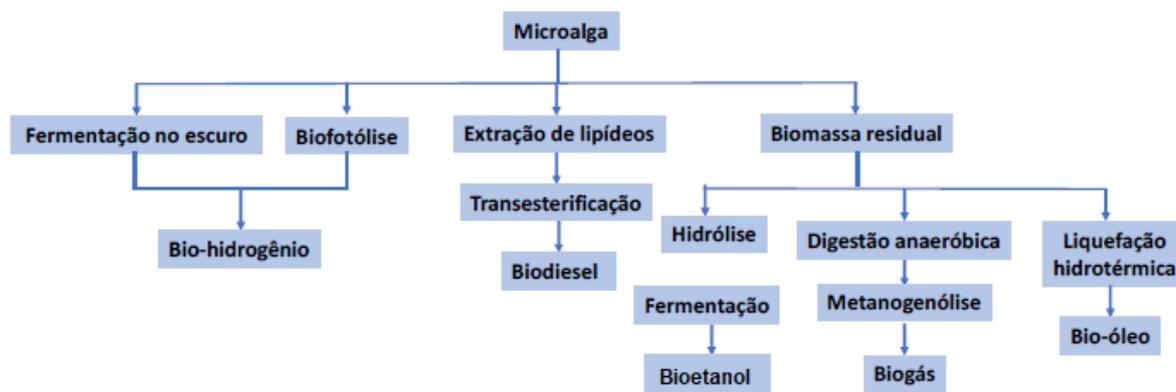
Como exemplo, durante a produção de bioetanol, são necessárias etapas de tratamento da biomassa visando a disponibilização dos açúcares fermentescíveis. Quando comparada a produção do etanol de primeira geração, verifica-se que essas etapas não são necessárias, uma vez que esses açúcares já estão disponíveis como no caso da produção a partir da cana-de-açúcar (LEE et al., 2022; ZABERMAWI et al, 2022).

3.2.3 Biocombustíveis de terceira Geração

O foco dos biocombustíveis de terceira geração é a produção direta a partir de macro ou microalgas através da realização de processos como extração, fermentação, hidrogenação,

processos hidrotérmicos ou transesterificação (Figura 5) (SAWARKAR et al., 2022; LIN; LU, 2021; ALALWANA; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Figura 5 – Biocombustíveis obtidos a partir de microalgas



Fonte: Autor “adaptado de” Alalwana; Alminshid; Aljaafari, 2019

Das matérias primas utilizadas para a produção dos biocombustíveis de terceira geração, as microalgas têm ganhado cada vez mais relevância devido a possibilidade de produção de vários tipos de combustíveis a partir das mesmas como etanol, biodiesel e, biogás, dependendo de características do processo e da espécie da microalga. Outro fato relevante é que os biocombustíveis de terceira geração possuem como uma das principais características o elevado teor de hidrogênio devido às proteínas e à clorofila, o que favorece os processos. Além disso, biocombustíveis de terceira geração possuem maior poder calorífico e menores densidade e viscosidade quando comparado com outras fontes de produção de biocombustíveis (ZABERMAWI et al, 2022; SAWARKAR et al., 2022; SILVA, 2019).

Essas características fazem com que seja um combustível mais relevante para a produção de biocombustíveis do que os utilizados na produção dos de primeira geração. Porém, é possível verificar vários desafios quanto a produção em larga escala devido, principalmente, a dificuldades referentes ao cultivo e processo de extração (SILVA, 2019).

3.2.4 Biocombustíveis de quarta Geração

A obtenção de um biocombustível de quarta geração envolve um processo de integração das demais gerações. A proposta desta geração é a modificação genética da planta para expressar enzimas capazes de promover a digestão da parede celular ou a realização de

modificações genéticas em microrganismos visando aumento da eficiência do processo de fermentação ou durante a produção de óleo, fonte para obtenção de biodiesel (CARVALHO, 2013). Dessa forma, é possível o aprimoramento das três gerações de biocombustíveis visando o aumento da produtividade, principalmente no caso da produção de bioetanol, foco do presente trabalho.

3.3 BIOETANOL

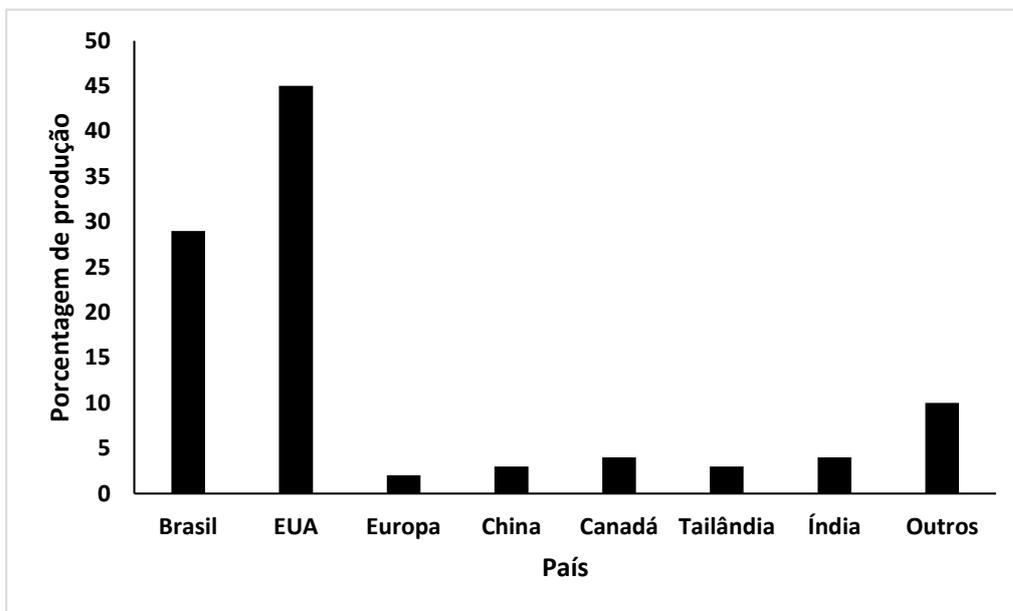
O bioetanol é considerado um combustível oxigenado, biodegradável, com baixa toxicidade e que promove uma baixa poluição ambiental. Esse biocombustível teve sua primeira produção por volta de 1846, porém, relatos indicam sua aplicação em 6000 a.C e 1805 a.C. O bioetanol, atualmente, é considerado o biocombustível mais produzido no mundo representando cerca de 94 % da produção global de biocombustíveis. Dessa produção, 60 % utilizam cana de açúcar e os 40 % restantes milho, beterraba, sorgo, trigo e, mandioca (LEE et al., 2022; SAWARKAR et al., 2022; PTASINSKI, 2016, cap. 8, p. 2).

Esse biocombustível é considerado uma das principais alternativas energéticas para diminuir problemas econômicos e ambientais em nível mundial, principalmente no Brasil, segundo maior produtor de bioetanol, conforme ilustrado na Figura 6. Dados obtidos da UDOP (União Nacional da Bioenergia) apontam que o volume produzido na Safra 2021/2022 no país foi de 27,53 bilhões de litros, somando o biocombustível à base de cana e de milho, podendo atingir a marca de 30 bilhões na próxima safra (UDOP, 2022; SAINI et al., 2020; WYMAN, 2018, p. 7; SCHUTTE; BARROS, 2010).

O bioetanol possui diversas aplicações em diversos setores industriais como, por exemplo, utilização do álcool anidro no segmento de produção de tintas, solventes e aerossóis, além da aplicação como combustível misturado à gasolina em proporções de 5 até 15 % na maior parte dos países e, 27 % no Brasil (YUAN et al., 2021; ERSHOV et al., 2016; EPE, 2008; DA PETROBRAS, 2007).

Destaca-se também a utilização do etanol hidratado (com aproximadamente 5 % de água) na produção de bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédios, vacinas e como combustível, principalmente no Brasil, país que possui grande parte da frota movida a etanol hidratado (YUAN et al., 2021; EPE, 2008; DA PETROBRAS, 2007).

Figura 6 – Maiores produtores de bioetanol (produção para 2023)



Fonte: Autor “adaptado de” Sawarkar et al., 2022;

O grande uso do bioetanol como combustível no Brasil se deve ao fato do território brasileiro possuir um clima favorável e uma vasta área para produção de cana de açúcar, matéria prima principal utilizada na produção de etanol no país (AGHAEI et al., 2022; PACHECO et al., 2011; SCHUTTE; BARROS, 2010). Destaca-se também a possibilidade de reaproveitamento da biomassa, o que favorece ainda mais o aumento da produção.

Neste cenário, estudos apontam que o mercado consumidor de etanol deverá crescer nos próximos anos no Brasil, principalmente por conta das leis ambientais que obrigam o uso de combustíveis renováveis e, também, por conta das exigências do Protocolo de Kyoto, além do aumento de produção de veículos automotores movidos à combustíveis mais sustentáveis (PACHECO et al., 2011; SCHUTTE; BARROS, 2010).

Dessa forma, tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção no setor ganham importância fundamental no país e duas formas de processamento industrial ganham ênfase para o aumento de produção de etanol (PACHECO et al., 2011; SCHUTTE; BARROS, 2010).

A primeira delas leva em consideração o aperfeiçoamento das tecnologias para produção de etanol de primeira geração a partir da sacarose da cana-de-açúcar exclusivamente em usinas que estão localizadas, em sua maioria, na região sudeste próximas às plantações devido a logística do processo. Como exemplo, no estado de São Paulo, a grande concentração de usinas

do setor encontra-se no interior do estado, estrategicamente próximo às principais estradas que interligam o país (PACHECO et al., 2011; SCHUTTE; BARROS, 2010).

Nessas usinas ocorre a produção do etanol de primeira geração (obtido a partir de produtos ricos em amido como grãos e tubérculos ou a partir de cana-de-açúcar ou beterraba) através das etapas descritas na tabela 2, destacando-se como principais a fermentação, a destilação e a retificação. Salienta-se que, para a produção a partir de grãos, existe a necessidade de uma etapa adicional de hidrólise enzimática do amido para liberação dos açúcares fermentescíveis, o que torna o processo mais caro quando comparado a produção direta a partir da cana ou da beterraba (BAJPAI, 2013, p. 762).

Porém, a viabilidade a longo prazo deste processo está sendo muito discutido, pois exige grandes quantidades de terras cultiváveis, podendo acarretar um aumento dos preços dos alimentos, impactando diretamente a cadeia alimentar atual. Assim, estudos apontam para o fato de que o processo de produção de etanol de primeira geração não consiga atender suficientemente às necessidades globais de energia (JIN et al., 2020; JOSHI et al., 2011).

Tabela 2 – Principais etapas de produção do etanol de primeira geração

| Etapa | Processo |
|--------------------------------|--|
| Tratamento inicial | La vagem da cana para retirada de impurezas e posterior realização do corte e separação de partículas metálicas residuais |
| Moagem e peneiramento | Processo de trituração para a produção do mela do seguida da separação de partículas sólidas maiores que tenham restado no processo |
| Caleação | Adição de leite de cal (pH entre 5,6-5,8) para floculação e separação de impurezas presentes no caldo |
| Esterilização | Aquecimento até aproximadamente 105 °C para eliminação de microrganismos. |
| Clarificação do caldo | Decantação do caldo para clarificação. |
| Preparo do mosto e do fermento | Correção da concentração de açúcares via diluição e ajuste do pH (4,5 e 5) e ativação da levedura. |
| Fermentação | Mistura do mosto e do fermento nas dornas para obtenção do vinho bruto (composto por células de levedura, açúcar não fermentado e etanol). |
| Destilação | Separação do etanol e do vinho bruto através de duas operações de destilação |
| Retificação | Separação dos álcoois superiores e elevação da concentração até o grau alcoólico do etanol hidratado (97%). |
| Desidratação | Tratamento com monoetilenoglicol, cicloexano ou peneiras moleculares para obtenção do etanol anidro (99,9%) |

Fonte: Autor “adaptado de” PROPEQ, 2020.

Dessa forma, deve ser abordada a segunda forma principal de ampliação da produção de bioetanol. Essa forma está relacionada com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas científicas de produção do bioetanol de segunda geração, também conhecido como etanol lignocelulósico, produzido a partir da conversão da celulose e hemicelulose, presentes em materiais lignocelulósicos (estrutura tridimensional complexa composta, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina), em bioetanol (JIN et al., 2020; SHANMUGAM et al., 2018; SCHUTTE; BARROS, 2010).

3.4 BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

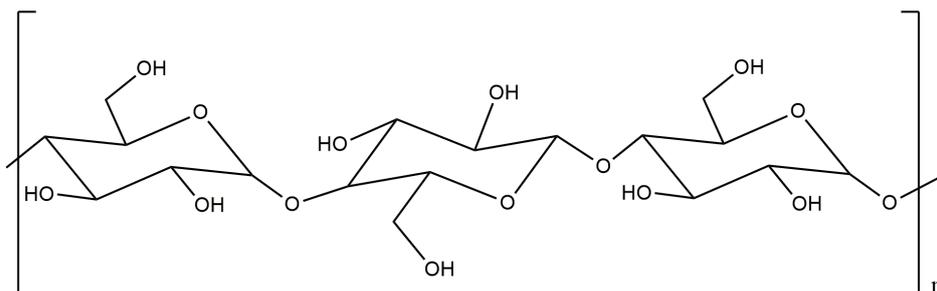
O processo de obtenção de bioetanol lignocelulósico surgiu como uma alternativa para aumentar demanda de bioetanol no mundo, visando o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar, cascas, gramíneas, resíduos florestais, resíduos da indústria de papel e celulose, entre outros (MELENDEZ et al., 2022; JIN et al., 2020; SHANMUGAM et al., 2018).

Esses materiais (que representam cerca de 330 milhões de toneladas por ano) são tradicionalmente queimados ou descartados devido ao seu restrito reaproveitamento produtivo e, também, ao baixo custo de mercado (MELENDEZ et al., 2022; JIN et al., 2020; SHANMUGAM et al., 2018).

Assim, os materiais lignocelulósicos são considerados fontes mais sustentáveis para obtenção de biocombustíveis apresentando diversas vantagens. Dessa forma, deve ser destacada a facilidade de controle do processo, baixo custo de investimento e, alto teor de açúcares fermentescíveis devido a sua composição (GANDAM et al., 2022; JIN et al., 2020; YUAN et al., 2021; ROCHA-MARTÍN et al., 2018).

Os materiais lignocelulósicos são considerados estruturas complexas e compactas constituída por celulose (40% a 60%) (Figura 7), hemicelulose (20% a 40%) (Figura 8) e, lignina (10% a 25%) (Figura 9) presentes em diferentes proporções (AGHAEI et al., 2022; WYMAN, 2018, p. 7).

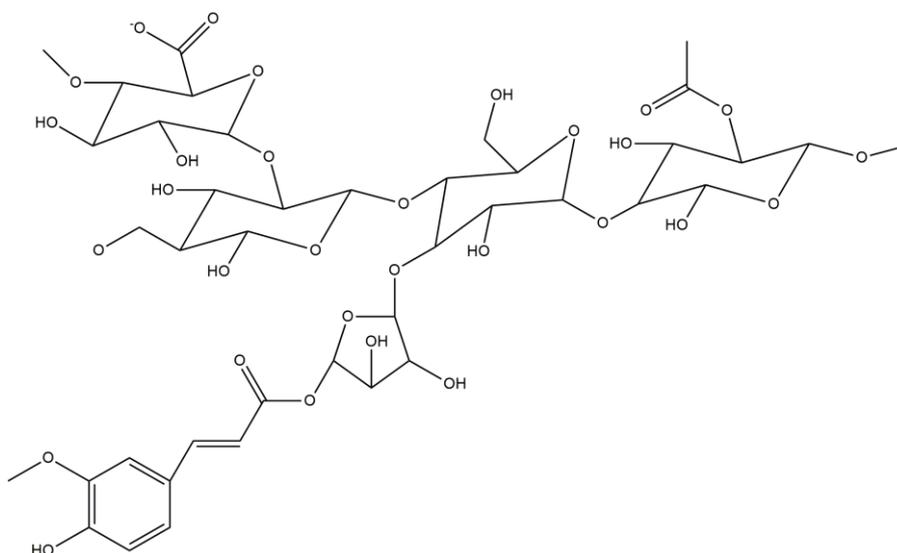
Figura 7 – Exemplificação de parte da estrutura polimérica da celulose



Fonte: Autor

Essas estruturas se encontram em associação através de ligações de hidrogênio e/ou ligação covalentes (Figura 10) que necessitam ser rompidas para disponibilização dos açúcares fermentescíveis, necessários para produção de bioetanol de segunda geração (GANDAM et al., 2022; JIN et al., 2020; YUAN et al., 2021; ROCHA-MARTÍN et al., 2018).

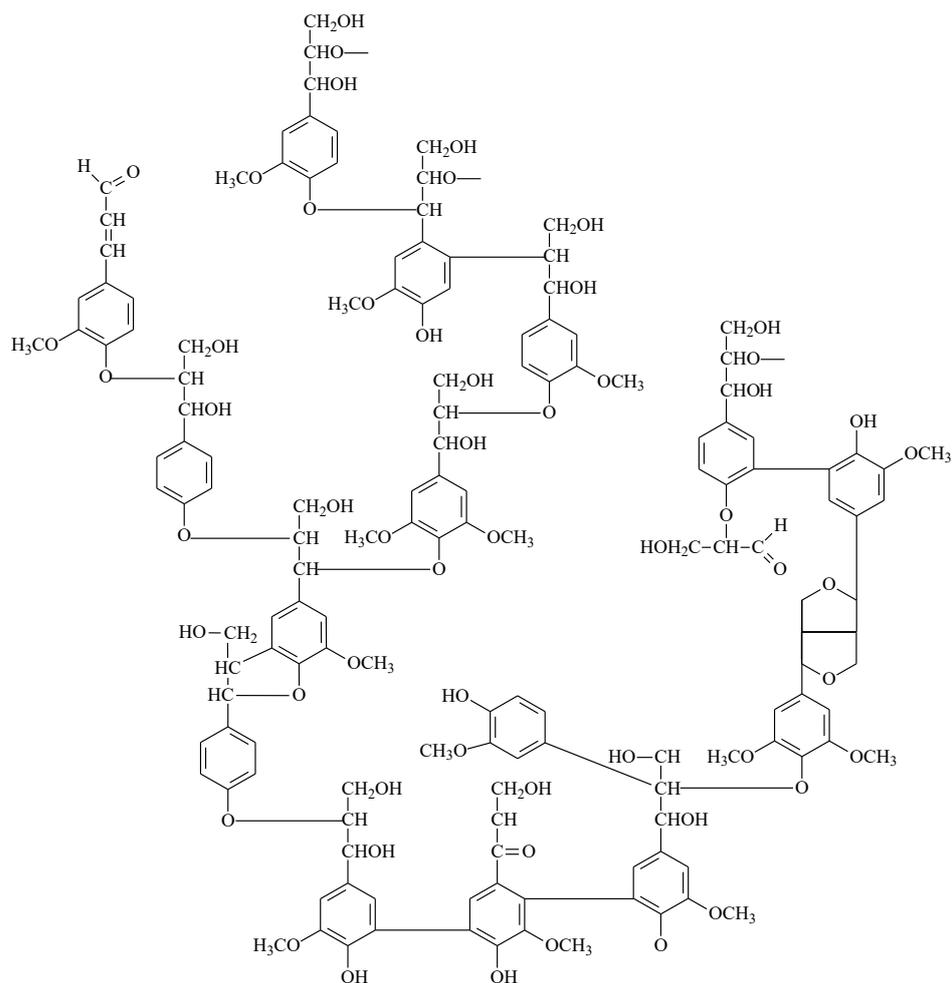
Figura 8 – Estruturas representativa de parte da hemicelulose



Fonte: Autor

Destes componentes, a celulose é formada por unidades de *D*-glicose, unidas por ligações glicosídicas β (1,4) em uma rede cristalina. Já, a hemicelulose consiste em uma estrutura complexa formada por diferentes açúcares sendo o principal a xilose e, a lignina que, por sua vez, consiste em uma macromolécula insolúvel em água constituída por unidades fenilpropanoídicas (AGHAEI et al., 2022; GANDAM et al., 2022; WYMAN, 2018, p. 7).

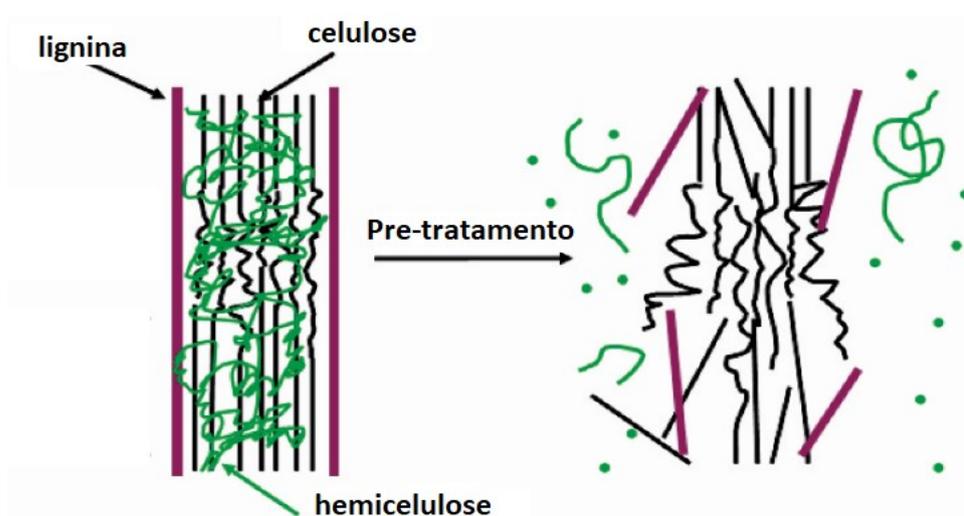
Figura 9 – Exemplificação da estrutura química da lignina



Fonte: Autor

Destes componentes, a lignina encontra-se presente na parede vegetal ligada normalmente a hemicelulose e é responsável pela resistência da planta a ataques por microrganismos bem como choques mecânicos. A lignina também gera rigidez e impermeabilidade ao material lignocelulósico (AGHAEI et al., 2022; WYMAN, 2018, p. 7; PACHECO, 2011). Assim, para realizar a conversão da celulose e da hemicelulose em açúcares fermentescíveis para obtenção do bioetanol é necessária a remoção da lignina por processos químicos, físicos ou biológicos (AGHAEI et al., 2022; GANDAM et al., 2022; SHANMUGAM et al., 2018).

Figura 10 – Arranjo do material lignocelulósico antes e após pré-tratamento



Fonte: Autor “adaptado de” Schwietzke et al., 2009.

Dessa forma, as técnicas envolvidas no processo de deslignificação consistem em operações de separação da celulose e hemicelulose da lignina durante o pré-tratamento e, etapas de hidrólise por via ácida (processo químico) ou enzimática (processo biotecnológico), para obter açúcares fermentescíveis a partir da celulose e da hemicelulose (YUAN et al., 2021; BALA; SINGH, 2019).

Os açúcares fermentescíveis obtidos no processo de hidrólise são, então, fermentados segundo procedimento usual já estabelecido e utilizados na produção de bioetanol de primeira geração. Porém, para o aproveitamento das pentoses provenientes da hemicelulose durante o processo de fermentação existe a necessidade de microrganismos específicos. Neste contexto, ainda existe uma barreira a ser superada na produção de bioetanol de segunda geração, o que mostra a importância da realização de estudos (JIN et al., 2020; PACHECO, 2011). Destaca-se também a possibilidade de produção de inibidores do processo de fermentação, gerados durante a etapa de deslignificação, dependendo do processo utilizado.

Dessa forma, para aumento da produção, é crucial investir na pesquisa e no desenvolvimento de tecnologias de produção de bioetanol de segunda geração, principalmente relacionadas as etapas de deslignificação e hidrólise visando o aproveitamento total das hexoses bem como das pentoses, o que levaria ao aumento do rendimento na conversão e redução dos custos do processo (AGHAEI et al., 2022; GANDAM et al., 2022; BALA; SINGH, 2019; PACHECO, 2011).

Neste cenário, o Brasil possui grande disponibilidade de biomassa em seu território e muitas pesquisas em andamento para aprimoramento das etapas de deslignificação e hidrólise.

Atualmente, a principal matriz de utilização e estudo ainda é o bagaço da cana-de-açúcar, o qual é muito utilizado para produção de combustíveis de segunda geração, gerando valor à cadeia produtiva e contribuindo para a diversificação da matriz energética do país. Em contrapartida, existem obstáculos para expansão da produção em escala comercial de biocombustíveis de segunda geração, os quais podem inviabilizar economicamente o investimento em as plantas industriais (VIDAL et al., 2019).

Com relação as etapas de deslignificação e hidrólise, os processos químicos ainda são os mais estudados e aplicados. Porém, devido ao elevado número de subprodutos gerados nessas etapas e que interferem diretamente na etapa de fermentação, pesquisas envolvendo rotas biológicas têm crescido significativamente, uma vez que a aplicação das mesmas pode levar ao aumento da produtividade devido a redução da formação de inibidores da etapa de fermentação (JIN et al., 2020; RAJESWARI; JACOB, 2020; SAINI et al., 2020).

Neste cenário, os principais aspectos, com impacto direto ou indireto na eficiência ou rendimento do processo de produção de etanol de segunda geração, são: falta de tecnologia eficiente de pré-tratamento de biomassa para degradação máxima de lignina e redução na formação de inibidores, perda de hemiceluloses e baixa eficiência no processo de fermentação das pentoses, eficiência e custo de enzimas celulósicas, otimização de coquetel de celulase e xilanase para hidrólise aprimorada tanto da celulose como da hemicelulose e, desenvolvimento de cepa de levedura para co-fermentação de hexose e pentose (AGHAEI et al., 2022; VIDAL et al., 2019). Dessa forma, existem poucas plantas de biocombustível de segunda geração por rotas enzimáticas produzindo em escala comercial no mundo, duas das quais estão no Brasil, (GranBio e Raízen) sendo que ambas utilizam resíduos de cana-de-açúcar como matéria-prima (VIDAL et al., 2019).

Também deve ser destacada que a produção de bioetanol lignocelulósico compreende quatro etapas fundamentais (Tabela 3) (BAUTISTA et al., 2019; RAJAK et al., 2018), sendo importante avaliar as diferenças quando comparado com a produção do etanol de primeira geração como evidenciado na figura 11 (YUAN et al., 2021).

Tabela 3 – Etapas fundamentais para produção de etanol 2G

| Etapa | Processo |
|----------------|---|
| Pré-tratamento | Promoção da quebra da estrutura cristalina da fibra de biomassas lignocelulósicas em geral composta principalmente de lignina, celulose e hemicelulose, visando recuperar a estrutura do açúcar de modo a ocorrer sua hidrólise de maneira mais fácil (ocorre a remoção ou degradação da lignina e hemicelulose, aumento da porosidade dos materiais) |
| Hidrólise | Conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, como hexoses (provenientes da celulose ou hemicelulose) e pentoses (provenientes da hemicelulose), por meio de enzimas hidrolíticas (hidrólise enzimática) ou por ácidos (hidrólise ácida). |
| Fermentação | O líquido proveniente do pré-tratamento, rico em açúcares é fermentado. Essa etapa pode ocorrer simultaneamente a etapa de hidrólise. |
| Destilação | Separação do etanol da mistura através do uso de uma coluna de destilação. |

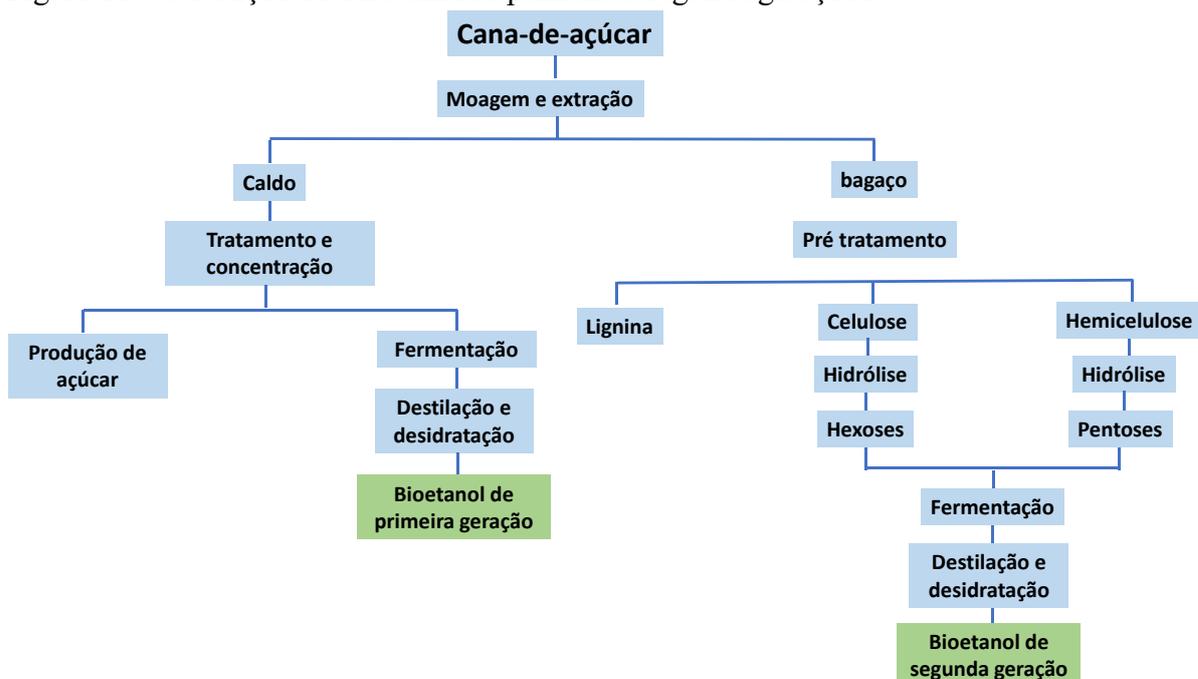
Fonte: Autor “adaptado de” Jin et al., 2020; Pacheco, 2011.

Porém, levando-se em consideração o processo de produção do etanol de segunda geração, é importante salientar que os estudos para desenvolvimento de novas tecnologias de produção do mesmo não excluem a tecnologia atual de produção de etanol de primeira geração e aprimoramento desta rota. Assim, ambas deverão existir com o objetivo de se complementarem, uma vez que o bioetanol gerado a partir da rota de primeira geração ainda se mostra de menor custo e, portanto, mais viável economicamente (VIDAL, 2019).

Porém, com o cenário econômico refletindo aumentos sucessivos no preço do petróleo e, também, com a alta exigência do consumidor final, buscando cada vez produtos sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente, os biocombustíveis de segunda geração devem apresentar competitividade crescente no mercado futuro (VIDAL, 2019).

Assim, se faz necessário continuar avançando sobre a tecnologia atual e alcançar novos ganhos com as tecnologias em desenvolvimento, principalmente as rotas enzimáticas de pré-tratamento e hidrólise (YUAN et al., 2021; PACHECO, 2011)

Figura 11 – Obtenção do bioetanol de primeira e segunda gerações



Fonte: Autor “adaptado de” Melo, 2020

3.5 PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento do material lignocelulósico é a primeira etapa do processo produtivo da bioetanol de segunda geração. Os principais objetivos deste processo são remover ou modificar as ligações entre a lignina e a hemicelulose na biomassa visando uma maior disponibilidade da celulose bem como favorecer a modificação da cristalinidade e porosidade da celulose e, assim, auxiliar no seu rompimento da estrutura cristalina da celulose para liberação dos açúcares fermentescíveis durante a etapa de hidrólise (AGHAEI et al., 2022; JIN et al., 2020; BALA; SINGH, 2019).

Dessa forma, além de ser economicamente atrativo, o processo ideal deve produzir altos níveis de pentoses através do aproveitamento da hemicelulose, evitar a degradação ou perda de carboidratos e promover a formação de inibidores dos processos subsequentes de hidrólise e fermentação (AGHAEI et al., 2022; JIN et al., 2020; BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011; JURADO et al., 2009).

Assim, o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais desafiadoras de todo o processo de produção de bioetanol requerendo a realização de estudos para potencializar esse processo. Essa etapa é uma parte importante das despesas operacionais gerais e da eficiência energética de qualquer processo de biocombustíveis e, embora essencial, normalmente

responde por mais de 30% dos custos de operação da biorrefinaria (BALA; SINGH, 2019; SANKAR et al, 2018).

Neste cenário, existem diferentes pré-tratamentos que levam a diferentes rendimentos e produtos finais e, a escolha do mais adequado, depende da biomassa empregada. Dentre eles, destacam-se os pré-tratamentos físicos, químicos e, biológicos (Tabela 4) (BALA; SINGH, 2019; SANKAR et al, 2018, WYMAN, 2018, p. 187-188).

Tabela 4 – Pré-tratamentos da biomassa

| Pré-tratamento | Função | Exemplo |
|----------------|---|--|
| Físico | Favorece a redução do tamanho das partículas ou o aumento da área de superfície do material | Explosão à vapor, pirólise, irradiação, hidrotermólise, etc. |
| Químico | Modificação da cristalinidade da celulose, rompimento das ligações entre celulose, hemicelulose e lignina e, deslignificação. | tratamento com álcalis, ácidos, organossolve (metanol, etanol e acetona, principalmente), CO ₂ , SO ₂ , com amônia e, líquidos iônicos |
| Biológico | Degradação da lignina e aumento da disponibilidade da celulose e hemicelulose. | Utilização de oxidorredutases como as peroxidases e lacase e microrganismos produtores dessas enzimas |

Fonte: Autor “adaptado de” Aghaei et al., 2022; Gandam et al., 2022; Bala; Singh, 2019, WYMAN, 2018, p. 183-187.

Em muitos casos, também podem ser utilizadas combinações de tratamentos como, por exemplo, tratamento química visando a quebra da estrutura da lignina seguido de um tratamento biológico visando a eliminação de resíduos de lignina que podem levar a inibição na etapa de hidrólise, quando realizada por via enzimática ou, na etapa de fermentação (WYMAN, 2018, p. 180). Assim, em geral, um pré-tratamento eficiente deve proporcionar altos rendimentos e conversões de hidrólise, não gerar inibidores da fermentação, ter baixo custo, não apresentar perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilitar a recuperação da lignina e consumir pouca energia (DA SILVA, 2021).

3.5.1 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico tem como objetivo principal aumentar a área superficial, reduzindo o tamanho de partícula e, conseqüentemente, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da biomassa devido a transformações da lignina e solubilização da

hemicelulose. Neste método, ajustam-se propriedades físicas como pressão, temperatura, moagem, radiação e congelamento da biomassa. Assim, os requisitos de energia para trituração mecânica dos materiais dependem do tamanho das partículas e do gasto característico da biomassa. Nestas condições, o custo com energia para quebrar as partículas pode tornar o tratamento caro (AGHAEI et al., 2022; BALA; SINGH, 2019; ROCHA-MARTÍN et al., 2018)

Pré-tratamentos físicos para a redução do tamanho de partícula são conduzidos na primeira etapa de pré-tratamento e usualmente utilizados combinados com outros métodos, considerados pré-tratamentos físico-químicos, os quais atuam fisicamente e quimicamente na transformação do material lignocelulósico. Exemplos desse método são pré-tratamento líquido com água quente, explosão a vapor e a explosão da fibra com amônia (AGHAEI et al., 2022; BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

Esses tratamentos podem ser realizados isoladamente ou seguidos por tratamentos biológicos como os com oxidoredutases visando a redução da concentração de compostos inibidores da fermentação gerados durante o pré-tratamento. Neste contexto, enzimas como a lacase tem levado a resultados significativos relacionados a eliminação de resíduos gerados a partir da lignina (NAZAR et al., 2022; ROCHA-MARTÍN et al., 2018; JURADO et al, 2009).

3.5.2 Pré-tratamento químico

No pré-tratamento químico são utilizados solventes orgânicos, inorgânicos, ácidos, bases e líquidos iônicos com o objetivo de separar as frações da biomassa, modificar a estrutura da composição do bagaço e, favorecer a conversão em açúcares na hidrólise devido a remoção da lignina e hemicelulose, bem como mudança da cristalinidade da celulose. Durante o processo, é necessário controlar a temperatura, pois em temperaturas elevadas pode-se degradar o açúcar e formar produtos tóxicos (YUAN et al., 2021; KACEM et al., 2016).

Porém, mesmo controlando-se as condições de processo, diversos subprodutos podem ser gerados como, por exemplo, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, entre outros, que interferem significativamente na etapa de fermentação (YUAN et al., 2021; KACEM et al., 2016).

O pré-tratamento químico mais utilizado consiste na adição de ácido à biomassa para a hidrólise dos polissacarídeos, atuando principalmente na solubilização da hemicelulose, deslignificação e mudança da cristalinidade da celulose (KACEM et al., 2016). Neste tipo de pré-tratamento, diferentes ácidos podem ser utilizados, tais como, os ácidos: nítrico, fosfórico,

clorídrico, sendo o ácido sulfúrico o mais utilizado. Além do tipo e da concentração do ácido, outros fatores como a temperatura e tempo têm influência nos rendimentos dos açúcares liberados (YUAN et al., 2021).

Já, o pré-tratamento alcalino envolve o uso de bases, tais como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e, de amônio. O uso de um álcali provoca a degradação do éster e das cadeias glicosídicas, resultando na alteração estrutural da lignina que é oxidada e removida, inchaço da celulose e mudança da cristalinidade da celulose e hemicelulose, que são reservadas no sistema (YUAN et al., 2021).

Em contrapartida, no pré-tratamento com solventes orgânicos, conhecido como organossolve, ocorre a promoção da deslignificação do material lignocelulósico através da solubilização da lignina e de parte da hemicelulose, pelo rompimento das ligações de hidrogênio. Esse tratamento, que pode ser realizado com diferentes solventes como álcoois, acetona, ésteres e aminas, apresenta várias vantagens quando comparado aos demais tratamentos químicos como, por exemplo, a separação da celulose da hemicelulose e lignina com elevada pureza e a redução da formação de inibidores derivados tanto da lignina, como da hemicelulose (REZANIA et al., 2020; MOOD et al., 2013).

O pré-tratamento organosolv apresenta como vantagens facilidade de recuperação dos solventes por destilação, possibilidade de isolamento da lignina como um material sólido e dos carboidratos como xarope, ambos promissores como insumos químicos. Entretanto, existem algumas desvantagens sendo possível destacar que os sólidos pré-tratados precisam ser lavados com solvente orgânico antes da lavagem com água, a fim de evitar nova precipitação da lignina dissolvida e que, devido ao preço dos solventes orgânicos, os mesmos devem ser recuperados o máximo possível, o que acarreta aumento no consumo de energia. O pré-tratamento organosolv tem que ser realizado através de um controle rígido e eficiente devido à volatilidade dos solventes (YUAN et al., 2021; JOSHI et al., 2011).

Por último, no pré-tratamento de expansão da fibra com amônia cria-se uma alteração físico-química no material lignocelulósico. Uma característica vantajosa desse processo é que a amônia utilizada pode ser recuperada e reutilizada, além da possibilidade de obter melhores conversões em temperaturas mais baixas quando comparado ao alcalino utilizando soda. Além disso, esse processo possibilita o processamento do material com mais de 60% de teor de matéria seca, ao contrário da maioria dos outros métodos (BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

Em suma, a amônia penetra na biomassa e reage de maneira exotérmica com a água presente na biomassa, formando hidróxido de amônio que catalisa as reações termoquímicas dentro do material. Dentre os resultados deste pré-tratamento, destacam-se o aumento da área de superfície acessível, a redução da cristalinidade da celulose, despolimerização parcial e remoção dos grupos acetil da hemicelulose, clivagem das ligações do complexo lignina-carboidrato e da ligação C-O-C da lignina (BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

3.5.3 Pré-tratamento biológico

Processos de tratamento que utilizam microrganismos ou enzimas são considerados, atualmente, alternativas sustentáveis aos processos físicos ou químicos convencionais. Os pré-tratamentos biológicos utilizam fungos, bactérias ou substratos como as enzimas produzidas por esses microrganismos. Esses processos apresentam como vantagem baixo consumo energético, baixo custo operacional, elevada eficiência bem como emprego de condições amenas de pH, temperatura e força iônica além da redução da formação de inibidores como furfural, hidroximetilfurfural, entre outros (YUAN et al., 2021; BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

Porém, destacam-se como desvantagens a necessidade de monitoramento do crescimento desses microrganismos e produção da enzima desejada, controle de contaminações bem como tempos prolongados de pré-tratamento (BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

Dos tratamentos biológicos, os que utilizam enzimas tem ganhado destaque no mercado, principalmente tendo como fonte microrganismos, devido ao seu rápido crescimento. Essas enzimas são proteínas que funcionam como biocatalisadores, aumentando a velocidade da reação através da redução da energia de ativação (AGHAEI et al., 2022; BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011),

Assim, devido ao potencial de catálise das enzimas bem como a possibilidade de obtenção a partir de microrganismos de maneira rápida e eficiente, muitos estudos têm sido realizados para aplicação de enzimas hidrolíticas na área de produção de biocombustíveis. Neste cenário, especificamente na etapa de pré-tratamento, merece destaque a utilização de enzimas pertencentes a classe das oxidorreduções como, por exemplo, peroxidases e lacases na etapa de deslignificação da biomassa (BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011).

As enzimas pertencentes a classe das oxidorreduções são produzidas por diversos microrganismos, destacando-se os fungos pertencentes aos basidiomicetos, em especial os

fungos da podridão branca, considerados um grupo notável em razão de seu sistema enzimático ligninolítico extracelular inespecífico. A partir desses fungos são obtidas diversas enzimas como, por exemplo, as lacases e peroxidases, como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase versátil (BALA; SINGH, 2019; JOSHI et al., 2011)

Dessas oxidorreduções, as lacases vem sendo muito estudadas por diversos pesquisadores em processos de deslignificação e de branqueamento de polpas celulósicas. As mesmas catalisam a oxidação de substratos fenólicos por um mecanismo de reação que envolve a redução de oxigênio a água. Essa reação é mediada por regiões de ligação de cobre na molécula da enzima levando a oxidação do substrato através da geração de intermediários de radicais livres (DA SILVA, 2021).

3.5.3.1 Tratamento com lacase

As lacases (enzimas multicobre oxidases) são produzidas na natureza por alguns insetos, bactérias e fungos - especialmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota, considerados fungos da podridão branca. As lacases são majoritariamente enzimas extracelulares, o que facilita a sua atividade em diferentes substratos e, também, a sua ação. Devido a essa característica, elas catalisam a oxidação de diversos compostos fenólicos e aromáticos com uma redução simultânea de oxigênio em água (SUMAN, et. al.2022; BAIL, 2020).

Lacases fúngicas são glicoproteínas que apresentam entre 520-550 aminoácidos destacando-se por sua grande relevância ambiental. Ecologicamente sobressaem-se, pois, participam do ciclo do carbono através da degradação de compostos de plantas recalcitrantes, em especial, a lignina. Além disso, apresentam baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre uma grande variedade de compostos, o que a torna uma enzima versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas industriais. Devido a sua versatilidade e, também, o seu viés ecológico, as indústrias demonstram cada vez mais interesse em lacases que possam suportar condições industriais como variação de temperatura, pH e compostos inorgânicos (SILVA et al., 2012; BAIL, 2020).

Além disso, estudos apontam para o fato de que as lacases podem ser utilizadas para degradar e modificar a lignina, um composto fenilpropanoídico, melhorando a eficiência dos processos de deslignificação e hidrólise subsequentes. Em contrapartida, a atividade da celulase pode ser afetada devido a competição por sítios de ligação de celulose entre as moléculas de

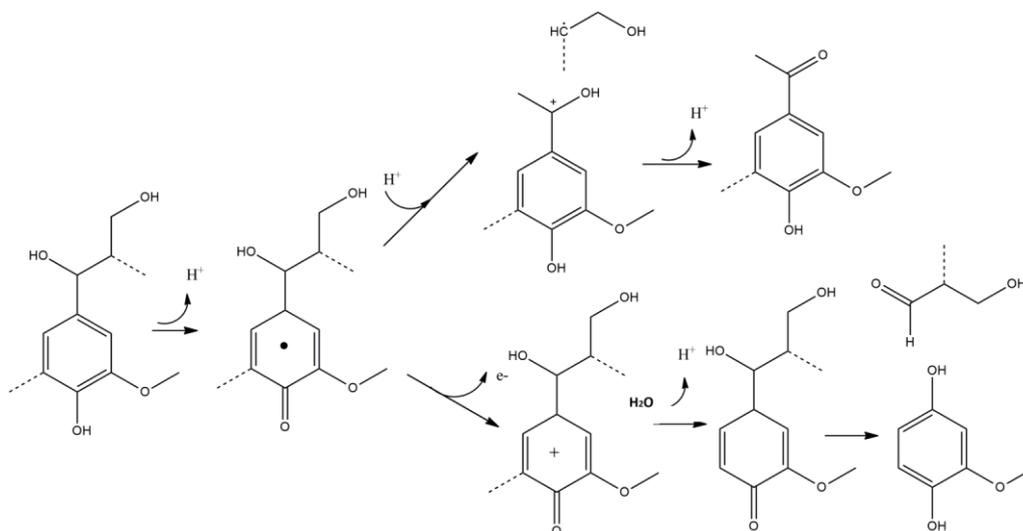
celulase e lacase, que causam fermentação ineficiente e redução do bioetanol (GOU et al., 2020).

Dentre as aplicações, no processo de deslignificação, a utilização de lacases levam a oxidação diretamente das subunidades fenólicas da lignina através da criação de radicais catiônicos no substrato, causando clivagem de ligações alifáticas ou aromáticas e despolimerização de lignina. Assim, as lacases possuem uma vasta versatilidade catalítica levando a oxidação de diversos substratos insolúveis em água como a lignina (Figura 12) (AGHAEI et al., 2022; DA SILVA, 2021, BALA; SINGH, 2019). Por outro lado, as unidades não fenólicas da lignina possuem maior potencial redox e não podem ser oxidadas diretamente pelas oxidases sendo importante, neste caso, a utilização em conjunto de mediadores (DA SILVA, 2021).

Na presença de mediadores (moléculas responsáveis por embaralhar elétrons entre enzima e substrato, aumentando o potencial redox da enzima e facilitando a oxidação do substrato), as lacases primeiro oxidam o mediador e, então, o mediador oxidado oxida as unidades não fenólicas da lignina (Figura 13), favorecendo o potencial de atuação da enzima, levando ao aumento de clivagens na estrutura da lignina e favorecendo a deslignificação (DA SILVA, 2021).

Assim, diversos autores têm descrito a aplicação de tratamentos lignina-mediador em diferentes processos, incluindo deslignificação de polpa, desintoxicação de resíduos e despolimerização de lignina (DA SILVA, 2021).

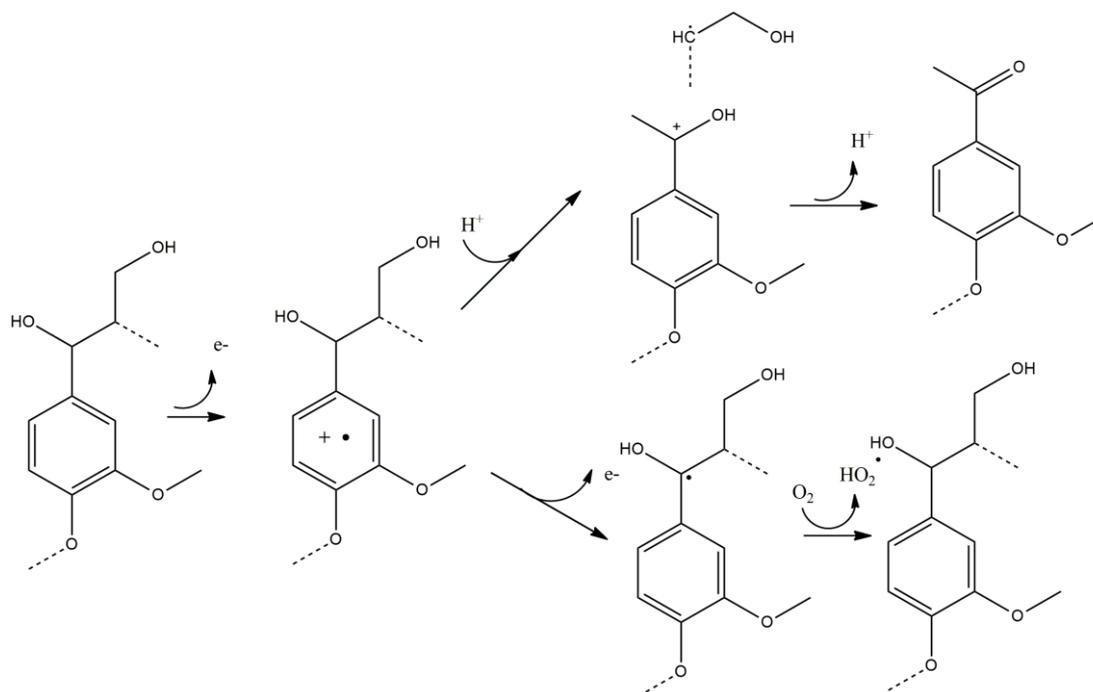
Figura 12 – Despolimerização da lignina catalisada por lacase



Fonte: Autor “adaptado de” Ferraz, 2014.

Considerando a presença de mediadores, tem-se:

Figura 13 – Despolimerização da lignina na presença de mediadores



Fonte: Autor “adaptado de” Ferraz, 2014.

3.6 PROCESSOS DE HIDRÓLISE DE MATERIAIS CELULÓSICOS

Esses processos têm como objetivo a geração de açúcares fermentescíveis a partir do teor de hemicelulose e liberação de diferentes açúcares) e de celulose (liberação de glicose) da biomassa lignocelulósica. Isso pode ser realizado por dois processos diferentes, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (AGHAEI et al., 2022; JOSHI et al., 2011).

3.6.1 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida, atualmente, é a rota mais utilizada e, também, a que possui tecnologia mais consolidada para o processo produtivo de bioetanol, visto que este processo vem sendo estudado e aplicado desde o início da produção de etanol de segunda geração. Na hidrólise ácida são comumente utilizados ácidos inorgânicos, sendo o ácido sulfúrico considerado o mais utilizado. Porém, em alguns casos utilizam-se outros ácidos como o ácido clorídrico, o ácido nítrico e os ácidos trifluoracéticos (JOSHI et al., 2011).

Durante o processo de hidrólise ácida a biomassa pode ser tratada de duas formas diferentes sendo que, a diferença fundamental dos processos está no teor de açúcares fermentescíveis gerados bem como no teor de subprodutos que podem interferir na etapa de fermentação. Dessa forma, pode ser utilizado ácido diluído (1,5 % de concentração) em temperaturas elevadas (cerca de 240°C). Esse processo, embora proporcione a quebra tanto da celulose quanto da hemicelulose, leva a degradação de parte considerável dos açúcares liberados, levando a uma redução da concentração final, que fica em torno de 50 a 60% e, também, a formação de inibidores do processo de fermentação como o furfural e o hidroximetilfurfural (WYMAN, 2018, p. 8; HENRY; WOODS, 2012, p. 16).

Em uma outra abordagem de hidrólise, são utilizados ácidos concentrados (30 a 70 % de concentração) em temperaturas mais baixas, o que leva a hidrólise da celulose e hemicelulose com rendimentos mais elevados sendo necessário, neste caso, a recuperação do ácido no final do processo, o que torna o processo de difícil execução devido a dificuldade de recuperação desse ácido no final do processo (SAINI et al., 2020; WYMAN, 2018, p. 8; HENRY; WOODS, 2012, p. 16; JOSHI et al., 2011).

Assim, diversos estudos estão sendo realizados visando a utilização da hidrólise enzimática que, embora considerado mais caro, se mostra mais sustentável e diminui a redução da formação de subprodutos que levam a inibição da levedura durante o processo de fermentação.

3.6.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis é uma etapa importante na conversão da biomassa em etanol (RAJ et al., 2019). Este processo é realizado, geralmente, em presença de microrganismos que secretam enzimas hidrolíticas durante seu crescimento no meio de cultura, ou sistemas enzimáticos comercialmente disponíveis, os quais são bastante utilizados. Os principais sistemas enzimáticos utilizados na hidrólise da biomassa lignocelulósica são as celulasas (compostas por endoglucanases, exoglucanases e, β -glicosidases), hemicelulasas (xilanase) e ligninasas, que favorecem a eliminação de inibidores fenilpropanoídicos que possam interferir na hidrólise (WYMAN, 2018, p. 258; ZABED et al., 2016; JOSHI et al., 2011).

No processo, diferentes celulasas atuam sendo as mesmas divididas de acordo com seu local de atuação no substrato, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Grupos enzimáticos e respectiva atuação no substrato

| Grupo Enzimático | Atuação |
|-----------------------|---|
| endoglucanases | Responsáveis por clivar as ligações internas da celulose favorecendo a redução do grau de polimerização |
| exoglucanases | As principais enzimas que fazem parte desse grupo são as celobiohidrolases (promovem a quebra da celulose pelas regiões terminais) e pelas glucanohidrolases (promovem a hidrólise inicial do material celulósico favorecendo a ruptura física do material) |
| β -glucosidases | Promovem a hidrólise da celobiose para liberação da glicose |

Fonte: Autor “adaptado de” Taha et al., 2016

Durante o processo, deve-se verificar a concentração enzimática, o substrato escolhido bem como sua concentração, o tempo de hidrólise, bem como a temperatura do processo, uma vez que temperaturas elevadas podem levar a inativação da enzima. Assim, normalmente são utilizadas temperaturas entre 40 e 50°C durante 48 a 72 horas visando a maior eficiência durante a etapa de hidrólise (SAINI et al., 2020; WYMAN, 2018, p. 259).

Embora esse processo leve a menor formação de subprodutos, verifica-se um aumento do custo do processo devido, principalmente, ao preço da enzima e ao fato da mesma ser utilizada somente uma vez. Assim, diversos estudos estão sendo realizados visando a redução do custo do processo através da análise de novas fontes de enzima, bem como metodologias eficientes de imobilização, o que levaria a possibilidade de reuso do biocatalisador (SAINI et al., 2020).

Neste processo a celulose é despolimerizada para liberação dos açúcares fermentescíveis por ação das celulasas em condições mais brandas de temperatura quando comparados ao processo de hidrólise ácida, o que leva a redução do custo energético. Porém, para se obter um bom rendimento durante a hidrólise existe a necessidade de aplicação de uma elevada concentração enzimática, o que eleva o custo do processo tornando o mesmo não competitivo quando comparado a hidrólise ácida (ZABED et al., 2016; JOSHI et al., 2011). Salienta-se também que o aumento da concentração de açúcares pode levar a inibição da enzima. Assim, é necessária a realização de uma avaliação ideal da concentração de substrato e enzima visando o maior rendimento do processo (TAHA et al. 2016; ZABED et al., 2016; JOSHI et al., 2011).

4 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

Nesta sessão são apresentados os materiais, os equipamentos e as metodologias adotadas na parte experimental.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho foram:

- Batata dextrose agar (Sigma Aldrich);
- Ácido sulfúrico 98 % (Dinâmica);
- Clorito de sódio (Sigma Aldrich);
- Acetona (Neon);
- Ácido acético (Dinâmica);
- Hidróxido de sódio (Neon);
- Lacase proveniente de *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich);
- CellicCTec2® (Sigma Aldrich);
- Ácido 2,2 - Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico) Sal Diamônio (ABTS) 98% (Sigma Aldrich);
- Siringaldazina (Sigma Aldrich);
- Extrato de malte (Sigma Aldrich);
- Extrato de levedura (Sigma Aldrich);
- Ureia (Neon);
- Tween 80 (Sigma Aldrich);
- Sulfato de cobre (Dinâmica);
- 2,5 - xilidina (Sigma Aldrich);
- Fosfato ácido de potássio (Neon);
- Glicose (Sigma Aldrich);
- Fosfato básico de sódio (Neon);
- Sulfato de magnésio (Neon);
- Peptona (Sigma Aldrich);
- *Saccharomyces cerevisiae* seco Y-904 (AB Brasil, Pederneiras, SP, Brasil);

- Sulfato de amônio (Sigma Aldrich);
- Hidróxido de sódio (Neon);
- Ácido ferúlico (Sigma Aldrich);
- Catequina (Sigma Aldrich);
- Citrato de sódio (Neon);
- Ácido cítrico (Neon);
- Ácido dinitrosalicílico (DNS);
- Lignina hidrolisada obtida a partir de bagaço de cana;
- Sulfato de amônio (Neon).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram:

- Analisador de umidade por infravermelho IV 2000;
- Espectrofotômetro UV/VIS Kasuaki;
- Cromatógrafo gasoso Shimadzu MDGC-2010;
- Câmara climatizada FOC215IL de 215L Panasonic;
- Shaker Orbital Innova 43;
- Freezer -80°C Panassonic;
- Centrífuga refrigerada de bancada DTR-1600;
- Shaker orbital de bancada SK-O330-PRO da Scilogex;

4.3 METODOLOGIAS

Nos itens 4.3.1 até 4.3.6 estão descritas as metodologias utilizadas durante o desenvolvimento do presente trabalho.

4.3.1 Obtenção dos fungos

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizado o fungo *Xylaria* sp. obtido partir das folhas de mandioca e submetido à identificação na BPI Biotecnologia pelo sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic

Analyzer e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank com 99 % de identidade com o fungo do banco de DNA.

O mesmo foi mantido em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) a 4 °C e submetido a 3 repiques consecutivos em BDA previamente esterilizado em autoclave para ativação do sistema enzimático. Após o processo de esterilização foi adicionado sulfato de gentamicina em uma concentração de 30 µg.mL⁻¹ ao meio para evitar a proliferação de bactérias.

Cada crescimento foi realizado por 7 dias a 24 °C em uma Câmara climatizada Panasonic. Após a realização do terceiro repique, o fungo foi submetido ao crescimento em meio específico para produção de oxidoredutases, especificamente em meio específico para obtenção de lacase (MPL).

4.3.2 Produção da oxidoredutase lacase

Após o terceiro repique, foi realizado o crescimento do fungo *Xylaria* sp. em meio líquido específico para obtenção de lacase (MPL) composto por extrato de malte (1,2 % p/v), Tween 80 (0,10 % p/v), CuSO₄ (0,0005 % p/v) e 2,5 - xilidina (0,4 mmol/L), KH₂PO₄ (1 g/L), glicose (10 g/L), Na₂HPO₄ (0,26 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,50 g/L) e, peptona (1 % m/v). O crescimento foi realizado em erlenmeyers contendo o meio MPL autoclavado sendo a temperatura de crescimento de 28 °C, a rotação do shaker de 170 rpm e o tempo igual 14 dias (RAJESH et al., 2013; SANTOS et al., 2011; GARCIA, 2006). A atividade enzimática foi determinada via espectroscopia na região do UV/visível pelo método da siringaldazina e, a concentração de proteínas via metodologia de Bradford.

4.3.2.1 Determinação da atividade enzimática - método Siringaldazina

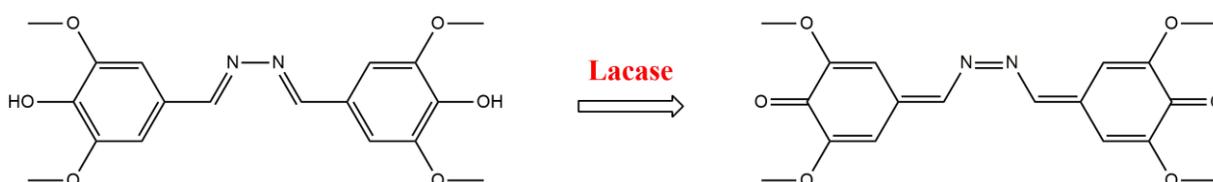
Durante a determinação da atividade de lacase no extrato obtido utilizou-se a metodologia da siringaldazina. Dessa forma, durante a determinação da atividade enzimática, 0,3 mL de siringaldazina foram adicionados em uma mistura composta de 2,2 mL de tampão fosfato pH 6,5 0,1 M, 0,5 mL do extrato enzimático contendo lacase. A leitura da absorbância foi realizada em 530 nm em um espectrofotômetro UV/VIS Kasuaki após 10 min de reação a temperatura ambiente. Como branco, no lugar do extrato enzimático, foi utilizada água. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se a equação 1:

$$\text{Atividade} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 1000 \times V_{\text{reação}}}{\epsilon \times V_{\text{enzima}} \times t} \quad (1)$$

em que: A representa a absorbância da amostra no início e após 10 min, $V_{\text{reação}}$ o volume total de reação (3 mL), V_{enzima} o volume de enzima utilizado durante a análise, e o coeficiente de absorvidade molar para a oxidação da siringaldazina ($65000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e t , o tempo de reação (10 min). Vale ressaltar que a equação está multiplicada por mil (1.000), para conversão de unidades do coeficiente de absorvidade, que está representado em litros, enquanto as demais unidades da equação estão representados em mililitros (ml).

Durante o ensaio, ocorre oxidação enzimática da siringaldazina devido a ação da lacase sendo obtido um produto de coloração rosa. A reação pode ser evidenciada na figura 14.

Figura 14 – Reação de oxidação da siringaldazina

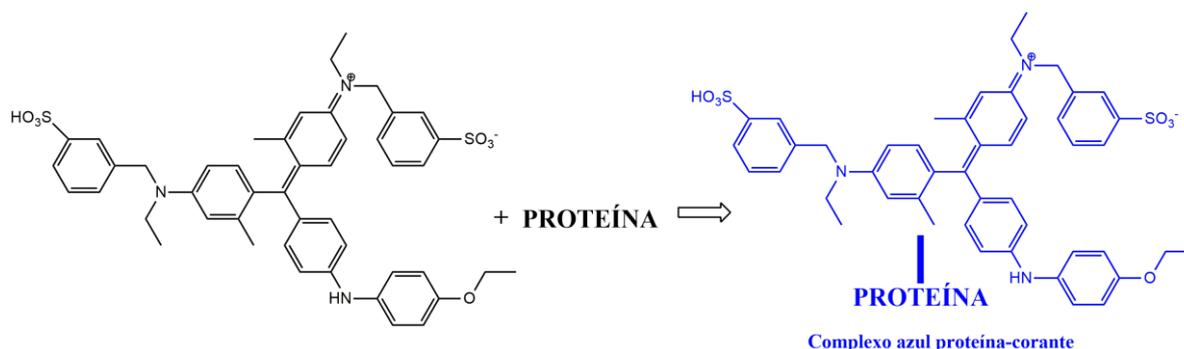


Fonte: Autor

4.3.2.2 Determinação da concentração de proteínas - método Bradford

Com relação a concentração de proteínas, a mesma foi determinada pelo método de Bradford (Figura 15) (BRADFORD, 1976), sendo essa determinação realizada utilizando-se 100 mL do extrato enzimático, 700 mL de água e 200 mL do reagente de Bradford. A solução foi agitada e transferida para uma cubeta de 1 cm. A leitura foi realizada a 595 nm. Para obtenção da curva de calibração foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de albumina sérica, que variaram de 0,0045 até 1,15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 15 – Reação entre a proteína e o corante Coomassie brilliant blue



Fonte: Autor

4.3.3 Deslignificação enzimática

Durante a etapa de deslignificação, o bagaço de cana previamente autoclavado em presença de água (15 minutos), foi submetido ao tratamento com extrato enzimático enriquecido em lacase obtido a partir de *Xylaria* sp modificando-se a temperatura e o tempo de tratamento (Tabela 6) através de um planejamento estatístico Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Figura 16). A caracterização da biomassa foi realizada conforme descrito no item 4.3.6, sendo as variáveis de saída foram deslignificação e a concentração de holocelulose.

O processo foi feito utilizando-se tampão acetato de sódio pH 4,6 (0,2 mol.L⁻¹). Em cada tratamento foram utilizados 5 g de bagaço de cana autoclavado, 50 mL de tampão e, 5 mL de extrato enzimático (Atividade específica = 0,01 U.mg⁻¹). Após a realização do tratamento, o material foi filtrado, lavado, seco em estufa a 60 °C e, submetido a caracterizações para determinação dos teores de lignina, holocelulose, celulose e, hemicelulose (BHARDWAJ et al., 2020).

Todos os ensaios foram realizados em uma incubadora Shaker Innova 43 utilizando-se uma rotação de 160 rpm sendo os resultados avaliados através da análise das superfícies de resposta bem como utilizando-se a função de desejabilidade.

Após a determinação da melhor condição de deslignificação enzimática, foi realizado um novo tratamento nesta condição visando a verificação da eficiência do tratamento. Nesta etapa também foi avaliada a capacidade de deslignificação do extrato enzimático obtido a partir de *Xylaria* sp. quando comparado ao efeito da lacase comercial.

Tabela 6 – Planejamento estatístico utilizado no tratamento de deslignificação

(continua)

| Variáveis codificadas | | Variáveis não codificadas | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| Temperatura (°C) | Tempo (dia) | Temperatura (°C) | Tempo (dia) |
| 0 | $-\sqrt{2}$ | 34,0 | 0,2 |
| -1 | +1 | 25,0 | 5,0 |
| +1 | -1 | 43,0 | 1,0 |
| 0 | $+\sqrt{2}$ | 34,0 | 5,8 |
| 0 | 0 | 34,0 | 3,0 |
| $-\sqrt{2}$ | 0 | 21,3 | 3,0 |
| -1 | -1 | 25,0 | 1,0 |
| +1 | +1 | 43,0 | 5,0 |

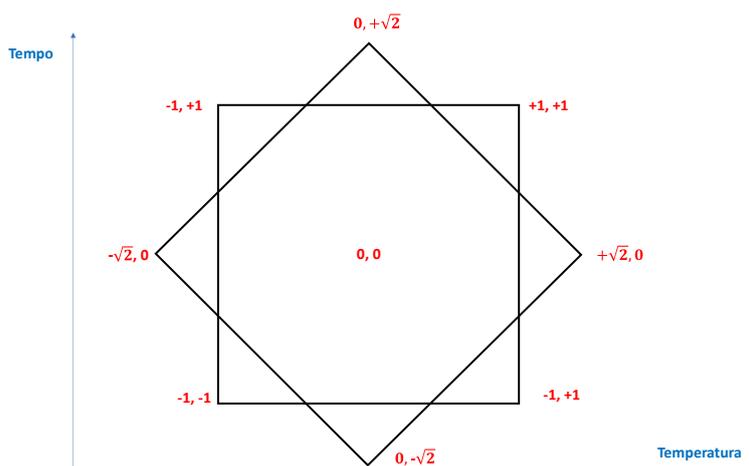
Tabela 6 – Planejamento estatístico utilizado no tratamento de deslignificação

(conclusão)

| Variáveis codificadas | | Variáveis não codificadas | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| Temperatura (°C) | Tempo (dia) | Temperatura (°C) | Tempo (dia) |
| $+\sqrt{2}$ | 0 | 46,7 | 3,0 |
| 0 | 0 | 34,0 | 3,0 |

Fonte: Autor

Figura 16 – Planejamento utilizado durante a otimização da deslignificação



Fonte: Autor

4.3.4 Mediadores

Determinada a melhor condição de deslignificação, verificou-se também a influência da utilização dos mediadores (ABTS, siringaldazina, catequina, ácido ferúlico e, lignina hidrolisada) no aumento da capacidade de deslignificação também foi avaliado. Segundo Suman e colaboradores (2022), uma proporção ideal de mediadores utilizada em trabalhos anteriores foi de 5 % a 10 % levando em consideração a quantidade de lacase utilizada.

Assim, nesta etapa, os mediadores testados foram adicionados em uma proporção massa/volume de 10 % (5 mg) em relação a quantidade de enzima utilizada (5 ml), a temperatura e o tempo escolhidos foram de 24,8 °C e 2 dias, uma vez que foram as melhores condições de processo encontradas na etapa anterior de deslignificação enzimática do bagaço autoclavado e pré-tratado.

Após a determinação do melhor mediador, foi realizado um novo tratamento para realização da hidrólise posterior ao pré-tratamento enzimático. Nesta etapa, aumentou-se a quantidade de enzima com o objetivo de aumentar a redução do teor de lignina. A quantidade

de mediador utilizada foi proporcional ao aumento do extrato enzimático. Assim, 10 g de bagaço autoclavado foram submetidos ao tratamento em presença de 100 mL de tampão acetato de sódio pH 4,6 (0,2 mol.L⁻¹), 20 mL de extrato enzimático (Atividade específica igual a 0,01 U.mg⁻¹) e, 20 mg de mediador siringaldazina em uma concentração de 0,18 mg.mL⁻¹. A temperatura de reação foi de 24,8 °C e, o tempo de reação de 2 dias.

4.3.5 Hidrólise enzimática

Após a avaliação da melhor condição de deslignificação utilizando como mediador a siringaldazina, o material obtido foi submetido ao processo de hidrólise enzimática na presença de celulase CellicCTec2® (Atividade enzimática = 214 FPU.mL⁻¹)

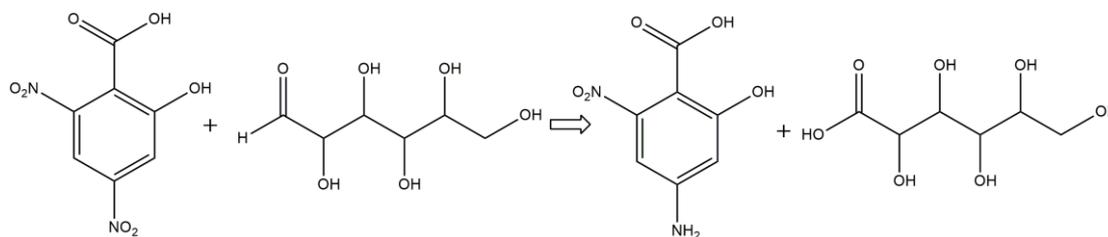
Dessa forma, foi realizada a hidrólise do bagaço de cana submetido a deslignificação enzimática utilizando como o mediador a siringaldazina. A hidrólise foi realizada em batelada em um shaker orbital utilizando-se uma concentração de bagaço de 15 % (1,5 g) (RAJ; KRISHNAN, 2019), 10 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8), temperatura de 50 °C, agitação de 250 rpm e uma concentração de enzima de 20 FPU/grama de amostra (0,14 mL). O tempo de hidrólise foi monitorado durante 96 h sendo avaliada a concentração de açúcares, pelo método DNS, após 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e, 96 h.

Após a determinação do tempo ideal de hidrólise (48 h), foi realizado um novo tratamento em batelada em um shaker orbital utilizando-se uma concentração de bagaço de 15 % (7,5 g) (RAJ; KRISHNAN, 2019), 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8), temperatura de 50 °C, agitação de 250 rpm e uma concentração de enzima de 20 FPU/grama de amostra (0,7 mL). O processo foi realizado durante um tempo de 48 h e, posterior a hidrólise, o material foi submetido ao processo de fermentação para a obtenção do bioetanol de segunda geração.

4.3.5.1 Determinação da concentração de açúcares fermentescíveis (DNS)

A concentração de açúcares fermentescíveis foi avaliada utilizando-se a metodologia do DNS (Figura 17).

Figura 17 – Reação entre os açúcares fermentescíveis e o DNS



Fonte: Autor

Para a quantificação da concentração de açúcares fermentescíveis pelo método do DNS, 0,5 mL de amostra foram misturados com 1,0 mL de uma solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e, a mistura submetida ao aquecimento sob ebulição durante 10 min. Posteriormente, os sistemas foram resfriados e diluídos para 25 mL sendo a avaliação realizada por espectroscopia UV/VIS a 540 nm em um Espectrofotômetro UV/VIS Kasuaki. A curva de calibração foi obtida através do preparo de soluções de glicose com diferentes concentrações (Apêndice A).

4.3.5.2 Cálculo da conversão mássica da hidrólise

A conversão mássica da hidrólise foi calculada baseada no teor de material lignocelulósico ou baseada no teor de holocelulose. Dessa forma, com o levantamento da curva de calibração utilizada durante a etapa da hidrólise, a qual está presente no apêndice C deste trabalho, encontrou-se a concentração de açúcares fermentescíveis (g.L^{-1}) e, utilizando-se o volume total de amostra foi possível a determinação da massa de açúcares fermentescíveis.

Dessa forma, levando-se em consideração essa massa bem como a massa inicial de amostra (material lignocelulósicos ou de holocelulose) pode-se calcular a conversão mássica utilizando-se a equação 2 (em termos de massa de material lignocelulósico) ou utilizando-se a equação 3 (em termos de massa de holocelulose):

$$\%_{\text{conversão}} = \frac{m_{\text{açúcares}}}{m_{\text{lignocelulósico}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%_{\text{conversão}} = \frac{m_{\text{açúcares}}}{m_{\text{holocelulose}}} \times 100 \quad (3)$$

em que: $\%_{\text{conversão}}$ representa a % de material lignocelulósico ou de holocelulose convertido a açúcares fermentescíveis

4.3.6 Produção de bioetanol

Após a realização da hidrólise, o hidrolisado foi submetido ao processo de fermentação na presença do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 sendo realizada, inicialmente, a ativação da levedura. Para isso, foi preparado o inóculo com uma concentração de levedura de 1,5 g.L⁻¹ utilizando 50 mL de um meio composto por extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹) e, glicose (40 g.L⁻¹). O processo foi realizado por 4,5 h utilizando uma temperatura de 34 °C e uma rotação de 200 rpm. Finalizado o processo, o sistema foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C sendo a levedura utilizada na etapa de fermentação.

Posterior a etapa de ativação da levedura, foi realizada a fermentação de 50 mL do hidrolisado, obtido anteriormente a partir do bagaço de cana, utilizando-se a levedura ativada nessa etapa. Foram adicionados ao sistema KH₂PO₄ (5,6 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1,4 g.L⁻¹), extrato de levedura (6,8 g.L⁻¹) e, ureia (5,32 g.L⁻¹). A reação foi processada em uma estufa a 34,50 °C durante 24 h (SONEGO et al., 2014). A produção foi avaliada após 30 min, 2, 4, 6, 9, 24, 40, 40 e 60 h de fermentação.

4.3.6.1 Quantificação do etanol produzido na fermentação.

Finalizada a etapa de fermentação, a concentração de etanol final foi determinada via CG em um cromatógrafo gasoso MDGC-2010. Durante a análise foi utilizado um Split de 1:10, uma temperatura do detector de 200°C e a rampa de aquecimento descrita na Tabela 7. A coluna utilizada foi uma Ttx®-Wax com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,3 mm. O volume de injeção foi de 1 µL. Utilizou-se o Headspace para a realização das análises sendo as amostras incubadas à 80 °C durante 25 min.

Tabela 7 – Rampa de aquecimento utilizada durante as análises via CG

| Temperatura (°C) | Tempo de aquecimento (min) | Tempo de permanência (min) |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 25 | - | 5 |
| 75 | 14 | 1 |

Fonte: Autor

O produto de fermentação obtido após 24 h também foi submetido a análise via CGMS em um cromatógrafo gasoso MDGC-2010 para avaliação da produção de outros produtos. Durante a análise foi utilizada uma coluna Rtx®5MS com 30 m de comprimento e diâmetro

interno de 0,3 mm. O volume de injeção foi de 1 L. Utilizou-se o Headspace para a realização das análises sendo as amostras incubadas à 80°C durante 25 min. As condições de análise foram as mesmas descritas na tabela 7.

4.3.6.2 Cálculo do rendimento da fermentação

Para encontrar o rendimento da fermentação, foi necessário realizar o levantamento da curva de calibração utilizada durante a etapa de avaliação da concentração de etanol após o processo de fermentação por diferentes tempos, a qual está presente no apêndice C deste trabalho. Com o auxílio dessa curva foi possível encontrar a concentração de etanol em função do tempo de fermentação (2, 4, 6, 8, 9 e 24h).

Sabendo-se que 1 mol de glicose produz 2 mols de etanol, conforme a estequiometria da reação: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2CO_2$ foi possível determinar o rendimento da etapa de fermentação conforme equação 4:

$$\%rendimento = \frac{n_{gli\ coseconsumido}}{n_{gli\ cosealimentado}} \times 100 \quad (4)$$

em que: $n_{glicoseconsumida}$ representa o número de mols consumido durante a fermentação e $n_{glicoseconsumida}$ a quantidade em mols de glicose inicial.

4.3.7 Caracterizações do bagaço

Nos itens 4.3.7.1 até 4.3.7.7 estão descritas as metodologias utilizadas nas caracterizações das amostras de bagaço antes e após a realização do processo de autoclavagem bem como tratamento de deslignificação.

4.3.7.1 Preparo inicial da amostra

Inicialmente, o bagaço de cana foi lavado em água corrente, seco em estufa a 75 °C e submetido ao processo de moagem em um moinho de facas de Wiley. Após essa etapa, o bagaço foi submetido a uma nova etapa de lavagem e, posteriormente, o mesmo foi seco a 75 °C até peso constante sendo caracterizado para determinação dos teores de umidade, extrativos, lignina solúvel, lignina insolúvel, holocelulose, celulose, hemicelulose e, teor de cinzas.

4.3.7.2 *Teor de Umidade*

O teor de umidade foi determinado com auxílio de um analisador de umidade por infravermelho IV 2000 com controle de temperatura de 50 a 200 °C, faixa de medida de 0 a 100 % e, sensibilidade de $\pm 0,1\%$. Para isso, cerca de 1,0 g de amostra foi colocado sob a balança do equipamento e mantido por aquecimento até a massa constante (aproximadamente 10 min). Em todas as etapas do projeto foi determinado o teor de umidade para realização da correção da massa e determinações das características do bagaço bruto e submetido aos tratamentos propostos no trabalho.

4.3.7.3 *Cinzas*

As cinzas em materiais lignocelulósicos são compostas, principalmente, de compostos inorgânicos presentes na amostra ou provenientes das etapas de tratamento. Assim, para a determinação do teor de cinzas, aproximadamente 1 g do material foram pesados em um cadinho previamente calcinado a 600 °C por 30 min e resfriado em dessecador. Posteriormente, o material foi submetido ao aquecimento em um forno mufla partindo da temperatura ambiente até 600 °C. A rampa de aquecimento foi de 9,6 °C.min⁻¹ em 60 minutos, sendo essa temperatura mantida por três horas. Após essa etapa, a temperatura foi reduzida para 200 °C em uma hora e, após atingir essa temperatura, o sistema foi retirado do forno e mantido em dessecador até resfriamento completo. O teor de cinzas foi determinado utilizando-se a equação 5 (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010).

$$\% \text{cinzas} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} 100 \quad (5)$$

em que: m_{final} representa a massa do resíduo após calcinação e, m_{inicial} a massa submetida ao processo de calcinação

4.3.7.4 *Extrativos*

Os extrativos são constituídos principalmente por sais, açúcares, polissacarídeos, ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas, esteroides, compostos fenólicos e, glicosídeos. Dessa forma, durante a determinação do teor de extrativos, aproximadamente

3,5 g de bagaço foram submetidos ao processo de extração em Soxhlet utilizando-se como solvente etanol 96% (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010). O tempo de extração foi de 6 h. Após o processo de extração, a solução foi rota evaporada para eliminação do solvente e a massa de extrativo determinada. O teor de extrativos foi calculado utilizando-se a equação 6:

$$\% \text{ extrativos} = \frac{m_{\text{extrativos}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (6)$$

em que: $m_{\text{extrativos}}$ representa a massa de extrativo obtida após eliminação do solvente, e m_{inicial} a massa inicial da amostra

4.3.7.5 *Lignina Total*

Durante a determinação do teor de lignina total utilizou-se a norma TAPPI T 222 om-22 (1979), com modificações. Assim, cerca de 1 g de amostra foi submetido ao tratamento com 20 mL de ácido sulfúrico 72% em massa e mantido sob agitação por cerca de 1h. Em seguida, o sistema foi diluído através da adição de 560 mL de água e mantido em refluxo por 4h. Decorrido esse período, o sólido residual foi lavado e seco em estufa à 80 °C, sendo o teor de lignina insolúvel calculado utilizando-se a equação 7. Vale ressaltar que os dados refletem à massa da amostra seca sendo descontado o teor de cinzas.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (7)$$

em que: m_{final} representa a massa de lignina e m_{inicial} massa inicial de amostra.

Já, para a determinação do teor de lignina solúvel, foi realizada a avaliação da absorvância em 215 e 280 nm sendo a quantificação realizada utilizando-se a equação 8. Já, a lignina total foi determinada através da soma da lignina insolúvel com a solúvel.

$$m_{\text{LS}} = \frac{0,58(4,53 \times A_{215} - A_{280})}{300} \quad (8)$$

Sendo que: m_{LS} representa a massa de lignina solúvel na amostra seca e sem extrativos.

4.3.7.6 *Holocelulose*

Durante a determinação do teor de holocelulose, cerca de 1 g do material vegetal, sem umidade nem extrativos, foi misturado com 60 mL de água e mantido sob agitação constante à 70 °C durante 30 min. Após essa etapa, adicionou-se ao sistema 1,5 g de clorito de sódio e 2 mL de ácido acético glacial e, a mistura foi mantida sob agitação por mais 30 min, sendo esse processo repetido mais duas vezes após (WISE; MURPHY, 1946). Em seguida, o sólido foi filtrado e lavado com água destilada e acetona e, posteriormente, seco em estufa à 55 °C, sendo o teor de determinado pela equação 9:

$$\% \text{holocelulose} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} 100 \quad (9)$$

Sendo que: m_{final} representa a massa de holocelulose, m_{inicial} representa a massa inicial da amostra.

4.3.7.7 *Celulose*

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados utilizando a metodologia descrita pela norma TAPPI T203 cm-99 (1979). Para isso foi necessário pesar 1,0 g da massa de holocelulose obtida no processo descrito no item 4.3.6.6 em um almofariz com capacidade de 100 mL. Após a pesagem, foram adicionados 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio 17,5%. Aguardou-se por cerca de dois minutos em repouso e, após esse período, a mistura foi homogeneizada por 8 minutos. Posteriormente a essa etapa, foram adicionados 40 mL de água destilada e transferiu-se toda a mistura para um funil e realizou-se a filtração com 300 mL de água destilada (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010). Após a filtração, o material foi seco em estufa à 65 °C e o teor de celulose determinado pela equação 10:

$$\% \text{celulose} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (10)$$

em que: m_{final} representa a massa final de alfa celulose, m_{inicial} representa a massa inicial da amostra.

Através do cálculo entre o teor de holocelulose e teor de alfa celulose corrigida, obtém-se o percentual de hemicelulose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção estão descritos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho.

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Durante o processo de obtenção do extrato enzimático, inicialmente o fungo FO2 (*Xylaria* sp.) (Figura 18), isolado a partir de folha de mandioca e mantido no Centro Universitário FEL, foi submetido a três processos consecutivos de crescimento em meio batata dextrose agar. Esse processo foi necessário para ativação do sistema enzimático do fungo e, dessa forma, produção da enzima de interesse, a oxidoredutase lacase.

Figura 18 – Fungo *Xylaria* sp.



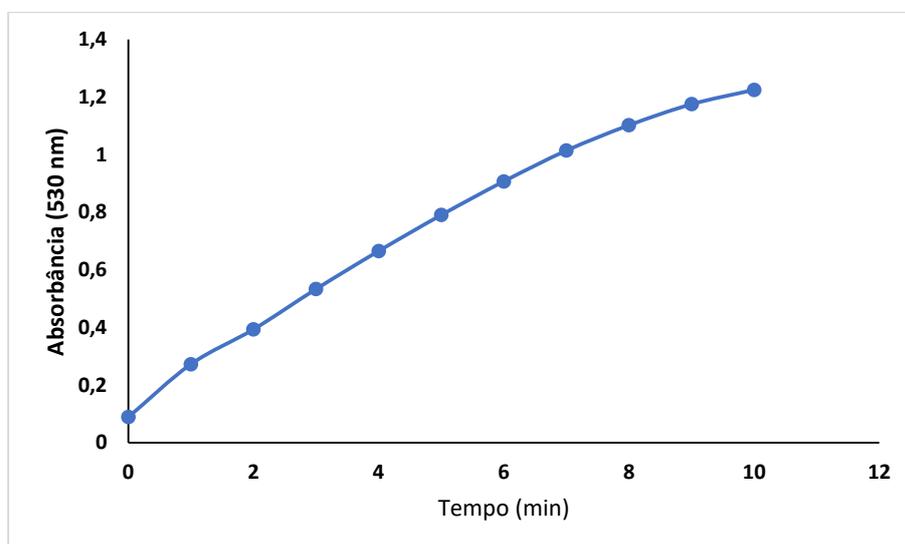
Fonte: Autor

Posteriormente a essa etapa, foi realizado o crescimento em meio líquido visando o aumento da produtividade de lacase pelo fungo. Esse processo foi realizado em condições estabelecidas em trabalhos anteriores. Finalizado o processo, o meio líquido foi avaliado para verificação da excreção da enzima de interesse pelo fungo. Dessa forma, utilizando-se o método da siringaldazina, foi monitorado o aumento da absorbância durante 10 min (Figura 19).

Analisando os resultados obtidos, foi verificada uma atividade enzimática de $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ no extrato sem nenhuma etapa de purificação. Foi determinada também a concentração de proteínas sendo necessário, para isso, a construção de uma curva de calibração utilizando-se albumina sérica em diferentes concentrações (Apêndice B). Após avaliados os

resultados verificou-se uma concentração de proteínas de $0,959 \text{ mg.mL}^{-1}$. Levando-se em consideração a equação 1 descrita no item 4.3.2.1 e a concentração de proteínas determinada conforme descrito no item 4.3.2.2, foi possível a determinação da atividade específica de $0,01 \text{ U.mg}^{-1}$.

Figura 19 – Variação da absorbância em função do tempo de reação



Fonte: Autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

Além da etapa de obtenção do extrato enzimático enriquecido em lacase, também foi necessária a realização do tratamento e caracterização do bagaço de cana, material lignocelulósico utilizado para o desenvolvimento do trabalho. Assim, o bagaço foi submetido ao processo de lavagem, secagem moagem seguida de uma nova etapa de lavagem e secagem visando a eliminação de impurezas. Após essa etapa, o bagaço foi caracterizado sendo determinado o teor de cinzas, extrativos, lignina insolúvel, lignina solúvel, holocelulose, celulose e, hemicelulose.

Após a caracterização, o bagaço de cana foi autoclavado em presença de água para facilitar o processo de deslignificação enzimática na presença de extrato enzimático rico em lacase sendo submetido a mesma caracterização do bagaço bruto (Tabela 8). Essa etapa foi realizada para aumentar a disponibilidade da lignina pelo processo de rompimento das interações lignina-celulose-hemicelulose e, assim, auxiliar no processo de deslignificação enzimática pela ação da lacase.

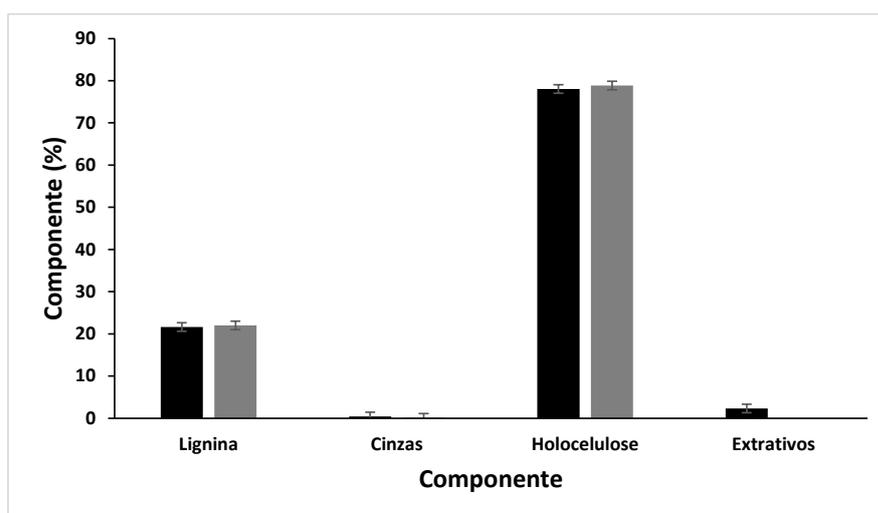
Tabela 8 – Caracterização do bagaço antes e após ao processo de autoclavagem

| Teores (%) | Bagaço de cana bruto (%) | Bagaço de cana autoclavado (%) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Extrativos | 2,3 ± 0,04 | 0,00 ± 0,0 |
| Cinzas | 0,4 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 |
| Lignina total | 21,7 ± 0,1 | 22,0 ± 0,1 |
| Lignina insolúvel | 19,5 ± 0,02 | 20,6 ± 0,02 |
| Lignina solúvel | 2,2 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1 |
| Holocelulose | 78,1 ± 0,6 | 78,9 ± 1,8 |
| Celulose | 40,9 ± 0,6 | 39,2 ± 1,7 |
| Hemicelulose | 37,2 ± 0,6 | 39,7 ± 1,7 |

Fonte: Autor

Analisando-se os resultados (Figura 20), verifica-se que após a autoclavagem, não foi evidenciada a presença de extrativos, porém, ocorreram modificações com relação ao teor de cinza, que reduziu significativamente (21,4 %). Com relação ao teor de lignina, verifica-se que o teor se manteve praticamente constante, porém, é possível evidenciar um pequeno aumento na concentração de lignina insolúvel (5,7 %) e redução no teor de lignina solúvel (35,8 %). Já, com relação ao teor de holocelulose, também é possível verificar que o mesmo se manteve praticamente constante.

Figura 20 – Comparação da composição do bagaço bruto e autoclavado

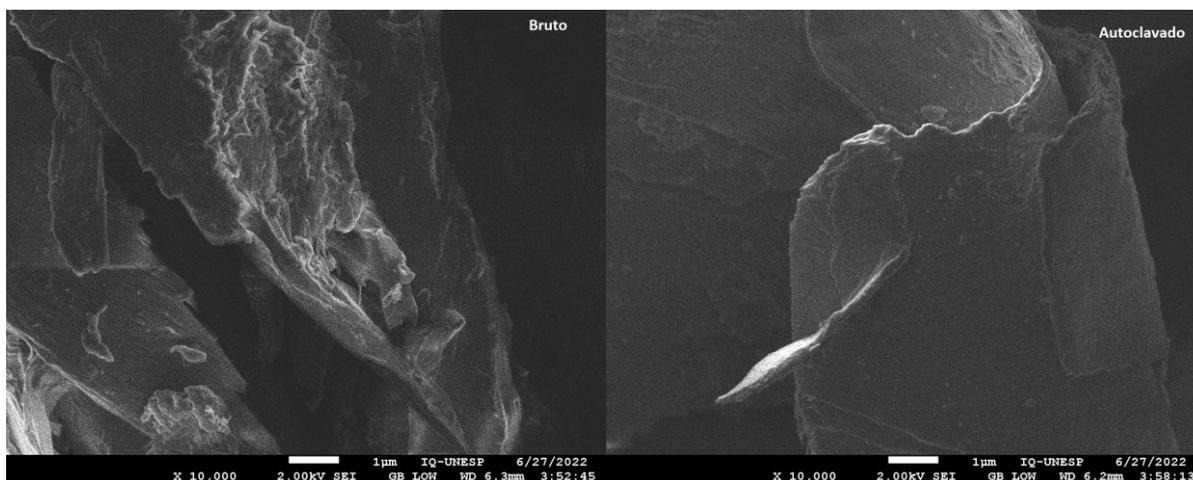


Fonte: Autor

Ao analisar-se as micrografias referentes ao bagaço antes e após o processo de autoclavagem, verifica-se que não ocorreram mudanças significativas no bagaço (Figura 21), corroborando com os dados de caracterização química. Salienta-se que o processo foi realizado

visando aumentar a disponibilidade das fibrilas para a realização do tratamento de deslignificação por via enzimática, uma vez que o processo visa promover a quebra das interações entre a lignina, a celulose e, a hemicelulose e, dessa formar, favorecer o processo de pré-tratamento enzimático posterior.

Figura 21 – Micrografias do bagaço bruto e autoclavado



Fonte: Autor

5.3 PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO ENZIMÁTICO

Após a caracterização do bagaço de cana e obtenção do extrato enzimático rico em lacase, o bagaço autoclavado foi submetido a etapa de deslignificação enzimática modificando-se o tempo e a temperatura (Tabela 9) para determinação das melhores condições de deslignificação enzimática.

Analisando-se os resultados da Tabela 9, verifica-se que, ao aumentar a temperatura, ocorre uma redução na deslignificação, porém, com relação ao aumento da concentração de holocelulose, verifica-se que a mesma permaneceu praticamente constante em relação a temperatura levando-se em consideração do desvio padrão. Esse fato pode ser explicado pela desativação da enzima com o aumento excessivo da temperatura. Com relação ao tempo, verifica-se que o aumento do tempo influencia negativamente no aumento da deslignificação devido a reação competitiva de lignificação. Salienta-se também que, segundo Nazar et al. (2022), o tratamento com lacase também favorece a redução da hidrofobicidade do material lignocelulósico favorecendo a etapa posterior de hidrólise por via enzimática.

Tabela 9 – Caracterização do bagaço após cada etapa de deslignificação

| Condição | Temperatura (°C) | Tempo (dia) | Lignina total(%) | Holocelulose (%) |
|----------|------------------|-------------|------------------|------------------|
| A | 34,0 | 0,2 | 19,5±0,04 | 81,7±2,1 |
| B | 25,0 | 5,0 | 18,0±0,1 | 80,2±0,1 |
| C | 43,0 | 1,0 | 20,2±0,1 | 80,3±0,3 |
| D | 34,0 | 5,8 | 19,8±0,1 | 78,6±2,0 |
| E | 34,0 | 3,0 | 18,4±0,3 | 82,4±0,2 |
| F | 21,3 | 3,0 | 17,7±0,3 | 84,3±0,2 |
| G | 25,0 | 1,0 | 17,6±0,04 | 81,0±0,7 |
| H | 43,0 | 5,0 | 19,2±0,1 | 81,7±0,6 |
| I | 46,7 | 3,0 | 19,1±0,5 | 83,4±1,3 |
| J | 34,0 | 3,0 | 18,6±1,9 | 81,7±1,7 |
| K | Bruto | | 21,6±0,1 | 78,1±0,6 |
| L | Autoclavado | | 21,7±0,1 | 78,9±1,7 |

Fonte: Autor

Verifica-se também que a utilização de temperaturas até 25 °C, conforme dados obtidos durante a realização do planejamento, mostram melhores resultados de deslignificação e, também, que o aumento da temperatura reduz a eficiência enzimática. Porém, o aumento do tempo pode levar ao aumento do processo de lignificação (reação oposta também catalisada pela lacase), o que justifica os dados obtidos. Esses dados se mostram relativamente elevados quando comparado com resultados reportados por Gou et al. (2020) que descreve que normalmente em processos de deslignificação enzimáticos utilizando lacases comerciais são obtidos rendimentos em deslignificação entre 17 e 24 %. Salienta-se também que, assim como reportado por Li et al. (2022), a realização do tratamento enzimático favoreceu a integridade a celulose e hemicelulose, o que favorece a melhor performance durante a etapa de hidrólise por via enzimática.

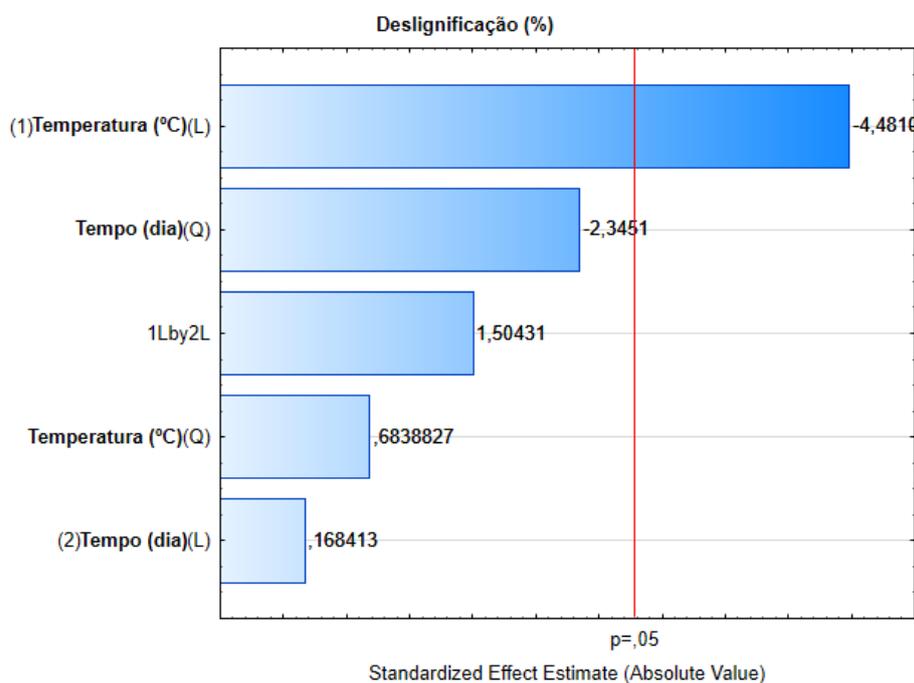
Porém, para a realização de uma avaliação mais efetiva das mudanças referentes a deslignificação influenciada pelo tempo e temperatura, foram avaliados os dados de deslignificação obtidos utilizando-se o programa Statistica. Assim, analisando-se a estimativa dos efeitos (Tabela 10), considerando um valor de p menor que 0,05, verifica-se que a variável que mais influenciou no processo foi a temperatura (modo linear). Esses dados podem ser justificados pela redução da atividade com o aumento dessa variável ou realização de tratamentos e temperaturas muito baixas. Através da análise do diagrama de Pareto, esses dados são confirmados (Figura 22). Salienta-se que, essa análise é feita através da padronização dos efeitos e cálculo dos com o nível de confiança de 95 %.

Tabela 10 – Estimativa dos efeitos para a (%) deslignificação

| $R^2 = 0,8869$ | | | | | | |
|------------------------|---------|-------------|---------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fator | Efeito | Erro padrão | t(4) | p | -95 % (limite de confiança) | +95 % (limite de confiança) |
| Mean/Interc. | 14,5895 | 1,4628 | 9,9736 | 0,0006 | 10,5281 | 18,6510 |
| (1)Temperatura (°C)(L) | -6,5622 | 1,4644 | -4,4811 | 0,0110 | -10,6281 | -2,4963 |
| Temperatura (°C)(Q) | 1,3279 | 1,9417 | 0,6839 | 0,5316 | -4,0632 | 6,7191 |
| (2)Tempo (dia)(L) | 0,2463 | 1,4624 | 0,1684 | 0,8744 | -3,8140 | 4,3066 |
| Tempo (dia)(Q) | -4,5322 | 1,9326 | -2,3451 | 0,0789 | -9,8980 | 0,8336 |
| 1L by 2L | 3,1120 | 2,0687 | 1,5043 | 0,2069 | -2,6317 | 8,8558 |

Fonte: Autor

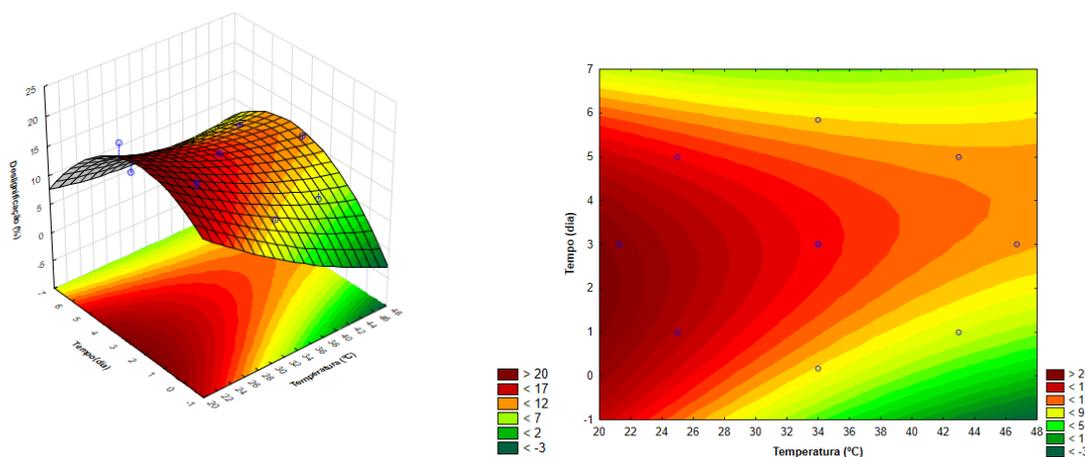
Figura 22 – Dia grama de Pareto para a (%) de deslignificação



Fonte: Autor

Análises das superfícies de resposta e de contorno referente a deslignificação (Figura 23), confirma os efeitos avaliados anteriormente, uma vez que a temperatura mostrou um efeito muito maior na deslignificação do que o tempo, que, quando muito elevado, reduziu a eficiência do processo. Verifica-se também que, tempo muito elevados desfavorecem a deslignificação devido a reação contrária de lignificação, que também é catalisada pela enzima lacase.

Figura 23 – Superfície de resposta e de contorno para a (%) de deslignificação



Fonte: Autor

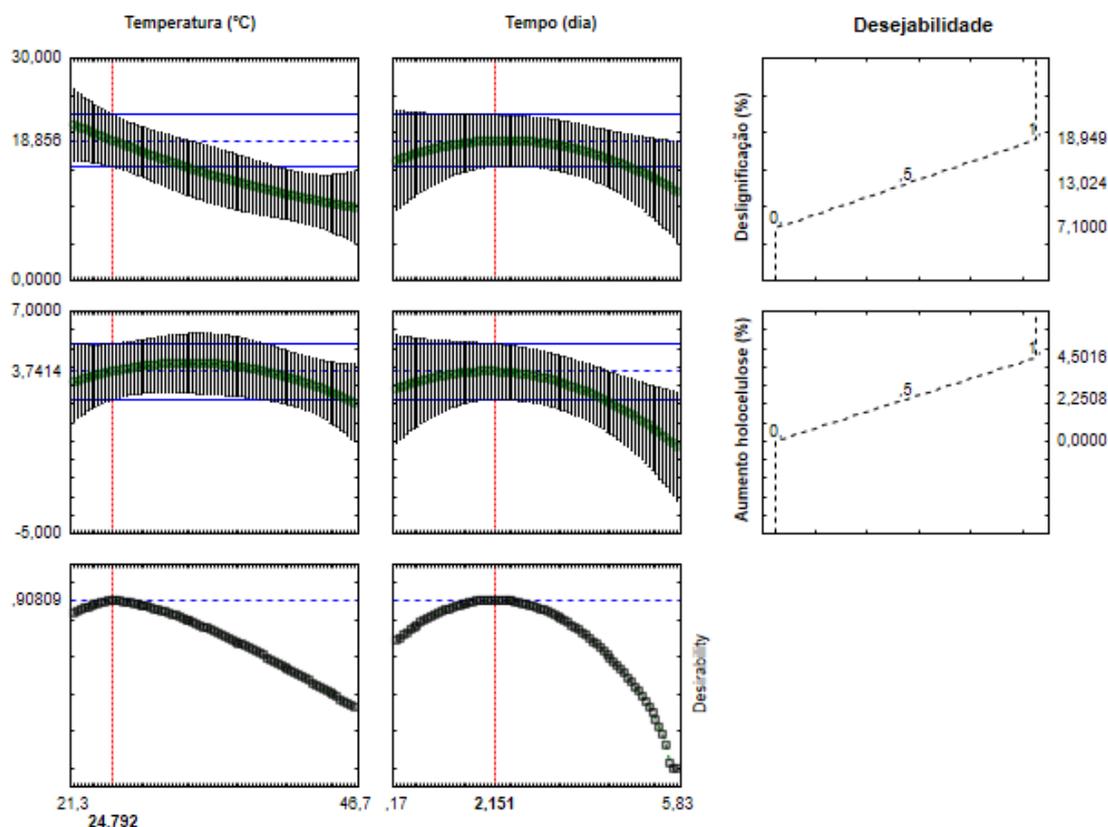
É importante destacar que a enzima lacase atua no processo de deslignificação através da indução do rompimento das ligações C-C da lignina, bem como processos de desmetilação, Ca-oxidação e quebra das ligações éteres (LI et al., 2022), não exercendo influência no aumento da concentração de holocelulose, corroborando com resultados evidenciados por Suman e colaboradores (2022) e por Gou et al. (2020).

Também foi determinada a condição ideal de deslignificação enzimática via ação de lacase utilizando-se a função de desejabilidade (Figura 24). Através da mesma, é possível encontrar condições que garantam a conformidade com os critérios de todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, fornecer o melhor valor na resposta conjunta sendo esse valor o mais desejável. A utilização dessa função possibilitou avaliar as duas variáveis de entrada (tempo e temperatura) em busca de obter as variáveis de saída (teor de deslignificação e aumento de holocelulose), as quais corroborassem matematicamente de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em busca de definir e determinar a melhor condição de deslignificação enzimática. Vale ressaltar que ao utilizar-se essa função, a desejabilidade pode variar de 0 a 1. Então, quanto mais próximo da unidade for este valor, melhor para a otimização simultânea (NOVAES et al., 2017; CANDIOTI et al., 2014).

Dessa forma, analisando-se os resultados, verifica-se que a desejabilidade global máxima atingida foi igual a 0,9. Esse valor indica que a otimização simultânea foi satisfatória para o par de variáveis escolhido. Sendo assim, um tempo de 2 dias utilizando uma temperatura de 24,8 °C se mostrou a condição ideal para promoção da deslignificação enzimática. Esse tempo foi suficiente para auxiliar no processo de deslignificação sem ocorrer a reação competitiva de lignificação. É importante destacar que o extrato enzimático utilizado mostrou

boa atuação até 25 °C, porém, em temperaturas superiores a 40 °C, verifica-se a menor eficiência do processo de deslignificação.

Figura 24 – Determinação da condição ideal de deslignificação



Fonte: Autor

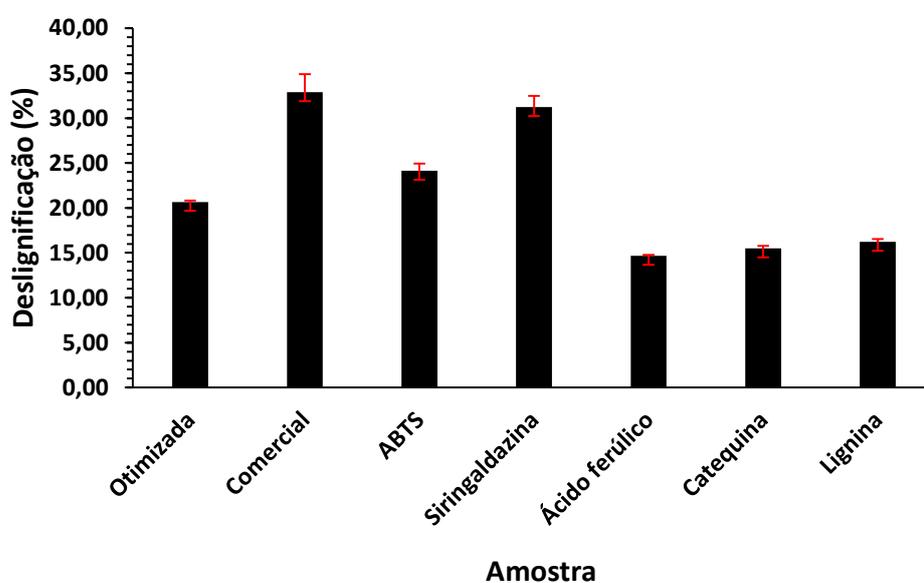
Dessa forma, após determinada a melhor condição de deslignificação, foi realizado um novo tratamento nessa condição sendo verificado uma redução na concentração de lignina de 17,8 %, valor relativamente baixo levando-se em consideração a continuidade para realização da hidrólise e fermentação. Porém, segundo Suman e colaboradores (2022), verifica-se a necessidade da utilização de mediadores para aumentar a eficiência da deslignificação enzimática.

A utilização desses mediadores reduz a reação de lignificação, auxiliando no aumento do rendimento da etapa de deslignificação. Assim, foi avaliada a influência da utilização de 5 mediadores no sistema (ABTS, siringaldazina, lignina, catequina e, ácido ferúlico). Também foi avaliada a eficiência do extrato enzimático obtido comparado com a lacase comercial (Figura 25, Tabela 11). É importante destacar que a lignina foi utilizada com o intuito de avaliar a ocorrência da reação inversa de lignificação.

Esses mediadores, conforme reportado por Aghaei et al. (2022) bem como por Bala; Singh (2019) favorecem a deslignificação devido a oxidação das subunidades fenólicas presentes na lignina que favorecem a clivagem das ligações alifáticas ou aromáticas e despolimerização de lignina bem como a oxidação das unidades não fenólicas da estrutura, aumentando a eficiência do pré-tratamento.

Esse aumento da eficiência ocorre devido ao fato de, na presença de mediadores, as lacases primeiro oxidarem o mediador e, então, o mediador oxidado levar a oxidação das unidades não fenólicas da lignina, levando ao aumento de clivagens na estrutura da lignina e favorecendo a deslignificação (DA SILVA, 2021).

Figura 25 – Deslignificação X mediador e enzima comercial



Fonte: Autor

Analisando-se os resultados obtidos para a deslignificação utilizando diferentes mediadores, verifica-se que a siringaldazina se mostrou mais eficiente obtendo-se uma deslignificação igual a $31,2 \pm 1,3$ % muito próximo ao da lacase comercial na ausência de mediador, que mostrou uma deslignificação de $32,9 \pm 2,0$ %. Verificou-se também um aumento da eficiência da deslignificação de 51 % ao adicionar-se o mediador quando comparado aos resultados na ausência dele.

Tabela 11 – Composição do material após tratamento na presença de mediadores

| Mediador | Holocelulose (%) | Lignina total (%) | Deslignificação (%) |
|----------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Otimizada | 84,0 ± 0,1 | 17,8 ± 0,2 | 20,7 ± 0,2 |
| ABTS | 85,7 ± 1,2 | 17,0 ± 0,8 | 24,1 ± 0,8 |
| Siringaldazina | 86,1 ± 1,6 | 15,3 ± 1,3 | 31,2 ± 1,3 |
| Lignina | 82,2 ± 0,1 | 18,7 ± 0,3 | 16,2 ± 0,3 |
| Catequina | 82,5 ± 0,2 | 18,9 ± 0,3 | 15,5 ± 0,3 |
| Ácido ferúlico | 81,7 ± 1,8 | 19,2 ± 0,1 | 14,7 ± 0,1 |
| Comercial | 86,3 ± 0,5 | 15,4 ± 2,0 | 32,9 ± 2,0 |

Fonte: Autor

Com relação ao teor de holocelulose (Tabela 11), verifica-se o maior teor após a realização do tratamento a presença de siringaldazina bem como uma redução do teor ao realizar-se o tratamento na presença de lignina oxidada, ácido ferúlico e, catequina. Esse efeito pode ser explicado pela introdução de unidades fenólicas na estrutura da lignina catalisado pela lignina (aumento da velocidade do processo de lignificação), o que desfavoreceu o processo de deslignificação inicial pela enzima lacase.

Ao analisar-se as micrografias do bagaço autoclavado e submetido a etapa de deslignificação, verifica-se que ocorreu o ataque à superfície devido a deslignificação (Figura 26), corroborando com os dados obtidos via caracterização química. Assim, durante a etapa final de hidrólise enzimática e fermentação para a produção de bioetanol, foi realizado um novo tratamento do bagaço de cana autoclavado utilizando como mediador a siringaldazina.

Figura 26 – Micrografias do bagaço autoclavado e tratado



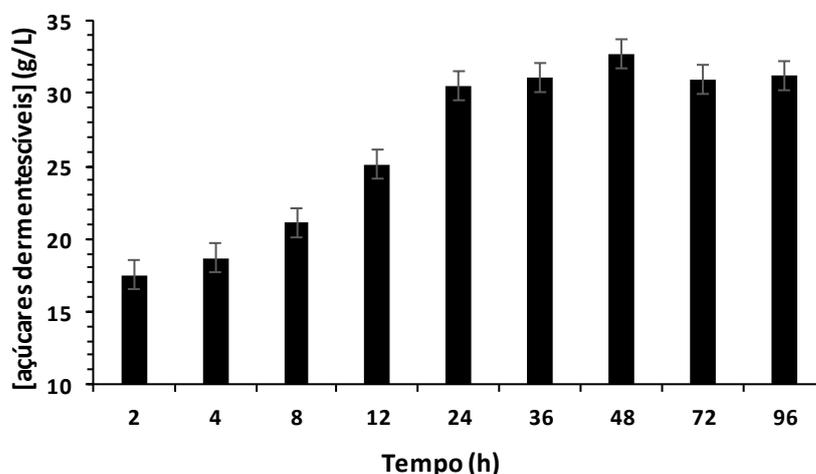
* Tratamento realizado nas condições ideais estabelecidas e utilizando siringaldazina como mediador
Fonte: Autor

5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA DESLIGNIFICADO

Após a realização de um novo processo de deslignificação enzimática utilizando siringaldazina como mediador, o bagaço tratado foi submetido ao processo de hidrólise enzimática (Figura 27, Apêndice A). Analisando-se os resultados, verifica-se que o tempo ideal de hidrólise foi de 48 h e que, após esse tempo, não ocorreram mudanças significativas. Salienta-se que a baixa concentração de açúcares fermentescíveis quando comparado a dados esperados descritos na literatura (BAJPAI, 2013) pode ser devido a presença de resíduos de siringaldazina que interferiram no processo enzimático devido a inibição. Assim, realização de lavagens mais efetivas após a etapa de deslignificação poderiam auxiliar no processo de hidrólise posterior.

É importante destacar também que foi obtida uma concentração de açúcares fermentescíveis máxima de 33 g.L⁻¹, o que sugere uma conversão máxima mássica de 40,4 % levando-se em consideração o teor de holocelulose do material final. Ao levar-se em consideração o teor de holocelulose, verificou-se uma conversão mássica de 50,8 %. Quando comparado com relatos de Bajpai (2013), que descreve que durante hidrólise enzimática são obtidas conversões de celulose entre 85-95 % verifica-se uma conversão média 43,6 % menor, o que corrobora com a hipótese de necessidade da realização de uma melhor lavagem para eliminação total de resíduos de siringaldazina.

Figura 27 – Determinação do tempo ideal de hidrólise enzimática



Fonte: Autor

5.5 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

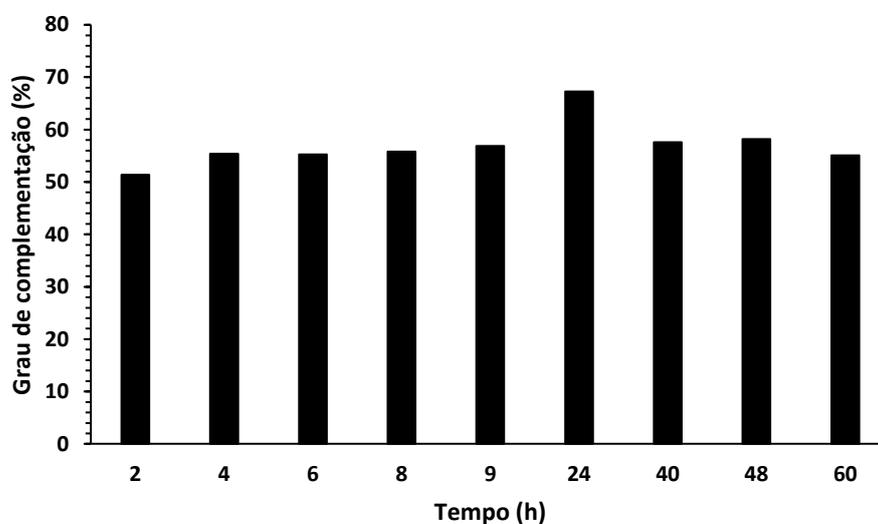
Após a realização da hidrólise, o hidrolisado foi submetido ao processo de fermentação sendo verificado um grau de complementação de 67,3 % (Tabela 12, Figura 28, Apêndice C) após 24 h de fermentação. Também é verificada a produção de outros compostos via análise realizada via CG/MS (Figura 29) que podem ter auxiliado na inibição do processo de fermentação.

Tabela 12 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentação

| Tempo (h) | Concentração de etanol (g.L ⁻¹) |
|-----------|---|
| 2 | 8,7 |
| 4 | 9,3 |
| 6 | 9,3 |
| 8 | 9,4 |
| 9 | 9,6 |
| 24 | 11,3 |
| 40 | 9,7 |
| 48 | 9,8 |
| 60 | 9,3 |

Fonte: Autor

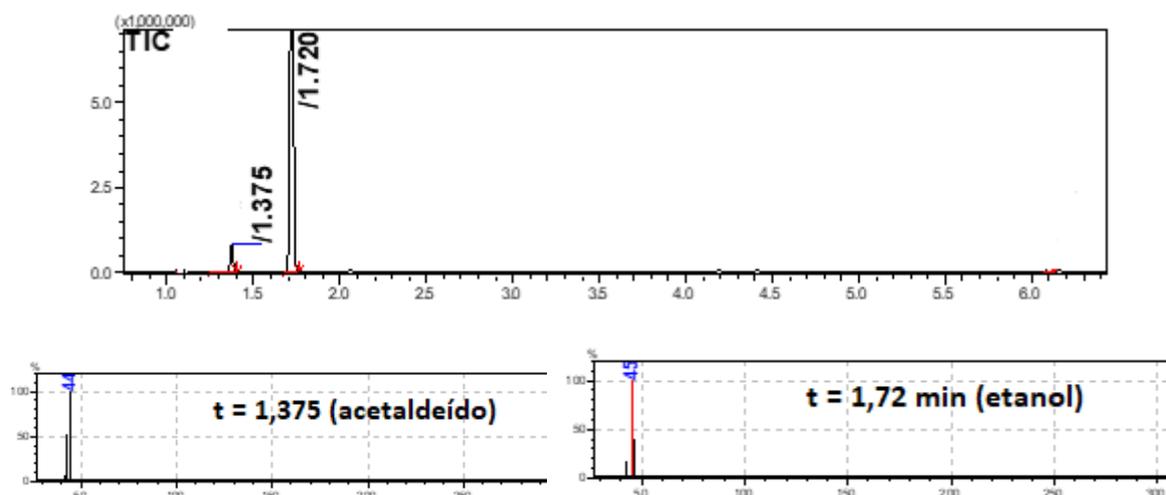
Figura 28 – Grau de complementação do processo de fermentação.



Fonte: Autor

Destaca-se também que a realização do processo por tempos superiores a 24 h levou a uma redução do grau de complementação. Essa redução pode ter sido gerada por perda de álcool por evaporação ou por maior produção de subprodutos a partir do bioetanol como, por exemplo, acetaldeído, que foi observado pela análise via CG/MS.

Figura 29 – Cromatograma e espectros de massas - fermentação



Fonte: Autor

6 CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foi possível verificar a eficiência da realização do processo de deslignificação por via enzimática utilizando extrato enriquecido em lacase obtido a partir de *Xylaria* sp. Sendo assim, um tempo de 2 dias utilizando uma temperatura de 24,8 °C se mostrou a condição ideal para promoção da deslignificação enzimática.

Verificou-se também a necessidade de utilização de um mediador visando intensificar o processo de deslignificação, sendo, nesse caso, a siringaldazina o composto que proporcionou os melhores resultados quando comparado aos resultados obtidos com a lacase comercial.

Posterior a etapa de pré-tratamento enzimático, foi realizada a hidrólise também por rota enzimática sendo verificada a eficiência do processo com uma porcentagem mássica de hidrólise de aproximadamente 41 % após 48 h. Salienta-se que melhoras no processo de lavagem do material são necessárias visando a remoção total da siringaldazina, que pode levar a uma redução da eficiência enzimática do complexo hidrolítico.

Também foi possível a realização do processo de fermentação sendo obtido um rendimento de 67,26 % após 24 h de fermentação.

Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se avaliar:

- O aumento da concentração de mediadores para avaliação da deslignificação;
- Aumento do volume do processo simulando produção em escala industrial;
- Realização do levantamento estatístico de custos do processo, promovendo um comparativo aproximado com os custos industriais visando uma conclusão justa sobre o rendimento do processo versus custo de produção real.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.; PISHVAEE, M. S.; MOHSENI, S. Third-generation biofuel supply chain: A comprehensive review and future research directions. **Journal of Cleaner Production**, v. 323, p. 129100, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652621032893>. Acesso em: 06 jun. 2022.
- AGHAEI, Siavash et al. A comprehensive review on bioethanol production from corn stover: Worldwide potential, environmental importance, and perspectives. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, p. 106447, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953422001088>. Acesso em: 06 jul. 2022.
- ALALWAN, H.A.; ALMINSHID, A.H.; ALJAAFARI, H.A.S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. **Renewable Energy Focus**, v. 28, p. 127-139, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1755008418303259>. Acesso em: 06 jun. 2022.
- AMBAYE, Teklit G. et al. Emerging technologies for biofuel production: a critical review on recent progress, challenges and perspectives. **Journal of environmental management**, v. 290, p. 112627, 2021. Disponível em: Emerging technologies for biofuel production: A critical review on recent progress, challenges and perspectives - ScienceDirect. Acesso em: 06 abr. 2022.
- BAIL, Jaqueline. **Lacase e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 05, Ed. 10, Vol. 14, pp. 21-30. Outubro de 2020. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/biologia/lacase>. Acesso em: 03 set. 2022.
- BAJPAI, Pratima. **Advances in bioethanol**. Springer Science & Business Media, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-81-322-1584-4>. Acesso em: 04 ago. 2022.
- BALA, A.; SINGH, B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of Saccharum biomasses for bioethanol production. **Renewable energy**, v. 130, p. 12-24, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960148118306785>. Acesso em: 25 mai. 2022.
- BHARDWAJ, Nisha et al. Bioconversion of rice straw by synergistic effect of in-house produced ligno-hemicellulolytic enzymes for enhanced bioethanol production. **Bioresour Technology Reports**, v. 10, p. 100352, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X19302427>. Acesso em: 25 mai. 2022.

BAUTISTA, Enrique G. et al. Pre-treatment of a sugarcane bagasse-based substrate prior to saccharification: effect of coffee pulp and urea on laccase and cellulase activities of *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of environmental management**, v. 239, p. 178-186. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479719303299>. Acesso em: 07 mai. 2022.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. Disponível em: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf. Acesso em: 02 jul. 2022.

CARVALHO, Leidiane C. et al. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, 2013. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/agrarias/cana-de-acucar.pdf>. Acesso em: 07 mai. 2022.

CANDIOTI, Luciana Vera et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914014000459>. Acesso em: 07 set. 2022

DA PETROBRAS, Comunicação Institucional do Abastecimento. Biocombustíveis 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado. **Newsday Consultoria de Comunicação e Marketing**, 2007. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/matprima1_000g7pcetcc02wx5ok0wtedt32e6jis7.pdf. Acesso em: 06 abr. 2022.

DA SILVA, Vitor G. Laccases and ionic liquids as an alternative method for lignin depolymerization: A review. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100824, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X21002024>. Acesso em: 15 mai. 2022.

DE PESQUISA ENERGÉTICA, EPE-Empresa. **Perspectivas para o Etanol no Brasil**, 2008. Disponível em: <https://unica.com.br/wp-content/uploads/2020/10/estudo-da-epe-perspectivas-para-o-etanol-no-brasil.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2022

ERSHOV, M.A. et al. Prospects of bioethanol fuels E30 and E85 application in Russia and technical requirements for their quality. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 228-232, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116303823>. Acesso em: 14 jun. 2022.

FERRAZ, André. **Enzimas em conversão de biomassa**, 2014. Disponível em: <http://www.debiq.eel.usp.br/aferraz/Enzimas%20em%20convers%C3%A3o%20de%20biomassa/aula%204%20estrutura%20fun%C3%A7%C3%A3o%20e%20aplica%C3%A7%C3%A3o%20de%20enzimas%20oxidativas.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2022.

GANDAM, Pradeep K. et al. Second-generation bioethanol production from corncob—A comprehensive review on pretreatment and bioconversion strategies, including techno-

economic and lifecycle perspective. **Industrial Crops and Products**, v. 186, p. 115245, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669022007282>. Acesso em: 06 jul. 2022.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 126 p. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/2253/1/Telma%20Alves%20Garcia.PDF>. Acesso em: 10 set. 2022.

GOU, Zechang et al. Innovative hydrolysis of corn stover biowaste by modified magnetite laccase immobilized nanoparticles. **Environmental Research**, v. 188, p. 109829, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935120307246>. Acesso em: 06 jul. 2022

HENRY, R.I.; WOODS, B.P. **Ethanol: production, cellular mechanisms, and health impac**. 1ª ed. E-book, Nova Biomedical, New York, 2012.

ILIĆ, D.D.; ÖDLUND, L. Integration of biofuel and DH production—Possibilities, potential and trade-off situations: A review. **Fuel**, v. 320, p. 123863, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236122007220>. Acesso em: 30 de abr. 2022.

JIN, Xianchun et al. Saccharification and detoxification of Na₂CO₃ pretreated rice straw with on-site manufactured enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus* to enhance bioethanol yield. **Renewable Energy**, v. 166, p. 117-124, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960148120318796>. Acesso em: 30 mai. 2022.

JORNAL CANA, Brasil deverá produzir 31% a mais de etanol de milho na safra 2022/23, **União Nacional da Bioenergia**, 04 mai. 2022, Diversas, p.1. Disponível em: [https://www.udop.com.br/noticia/2022/05/04/brasil-devera-produzir-31-a-mais-de-etanol-de-milho-na-safra-2022-23.html#:~:text=Na%20safra%202021%2F22%2C%20o,de%20Economia%20Agropecu%C3%A1ria%20\(Imea\)](https://www.udop.com.br/noticia/2022/05/04/brasil-devera-produzir-31-a-mais-de-etanol-de-milho-na-safra-2022-23.html#:~:text=Na%20safra%202021%2F22%2C%20o,de%20Economia%20Agropecu%C3%A1ria%20(Imea).). Acesso em: 18 set. 2022

JOSHI, Bishnu et al. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 6, n. 8, p. 172-182, 2011. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/8D9C02C11840>. Acesso em: 30 abr. 2022.

JURADO, Miguel et al. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6378-6384, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409009092>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KACEM, Imen et al. Multistage process for the production of bioethanol from almond shell. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 154-163, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416303510>. Acesso em: 30 mai. 2022.

KARIMI-MALEH, Hassan. et al. Advanced integrated nanocatalytic routes for converting biomass to biofuels: A comprehensive review. **Fuel**, p. 122762, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121026259>. Acesso em: 30 abr. 2022.

KRISHNAN, Radhakrishnan Y. et al. Advanced thermochemical conversion of algal biomass to liquid and gaseous biofuels: A comprehensive review of recent advances. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 52, p. 102211, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213138822002636>. Acesso em: 30 abr. 2022.

LEE, Kang H. et al. Energy-efficient glucose recovery from chestnut shell by optimization of NaOH pretreatment at room temperature and application to bioethanol production. **Environmental Research**, p. 112710, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35026183/>. Acesso em: 14 jun. 2022.

LI, Huanan et al. Combination strategy of laccase pretreatment and rhamnolipid addition enhance ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126414, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421017569>. Acesso em: 06 jul. 2022.

LIN, C-Y.; LU, C. Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 136, p. 110445, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032120307322>. Acesso em: 15 mai. 2022.

MAHAPATRA, Sangita et al. Biofuels and their sources of production: A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. **Energy Nexus**, v. 4, p. 100036, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S277242712100036X>. Acesso em: 14 jun. 2022.

M'BAREK, Hasna N. et al. Consolidated bioethanol production from olive mill waste: Wood-decay fungi from central Morocco as promising decomposition and fermentation biocatalysts. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00541, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20304574>. Acesso em: 06 abr. 2022.

MELLENDEZ, Jesus R. et al. Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 160, p. 112260, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032122001812>. Acesso em: 07 abr. 2022.

- MELO, Nicholas R. **Etanol 2G: Processo produtivo e seu contexto atual no Brasil**. 2020. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/31885>. Acesso em: 16 mai. 2022
- MIRELLA, Liza. Usinas da região vendem 'títulos verdes' no mercado financeiro. **Diário da região**, 2021. Disponível em: <https://www.diariodaregiao.com.br/economia/usinas-da-regi-o-vendem-titulos-verdes-no-mercado-financeiro-1.58561>. Acesso em: 07 abr. 2022.
- MOOD, Sohrab H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032113004103>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- MORAIS, J.P.S.; ROSA, M.F.; MARCONCINI, J.M.; **Documento 236**: Procedimento para Análise Lignocelulósicas. Campina Grande, PB: Embrapa, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2022.
- NAZAR, Mudasir et al. Biological delignification of rice straw using laccase from *Bacillus ligniniphilus* L1 for bioethanol production: A clean approach for agro-biomass utilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 360, p. 132171, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622017772>. Acesso em: 06 jul. 2022.
- NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n3a19.pdf>. Acesso em: 07 set. 2022
- PACHECO, Thályta F. **Produção de etanol: primeira ou segunda geração?** 2011. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32985/1/CITE-04.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2022.
- PROPEQ. Biocombustíveis: **Etanol de Primeira Geração**, 2020. Disponível em: <https://propeq.com/etanol-biocombustiveis/>. Acesso em: 15 abr. 2022.
- PTASINSKI, Krzysztof J. **Efficiency of biomass energy: an exergy approach to biofuels, power, and biorefineries**. John Wiley & Sons, 2016, cap. 8.
- RAJ, K.; KRISHNAN, C. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 32-40, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669019300391>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- RAJAK, R. C.; BANERJEE, R. An eco-friendly process integration for second generation bioethanol production from laccase delignified Kans grass. **Energy conversion and management**, v. 157, p. 364-371, 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196890417311123>. Acesso em: 15 abr. 2022.

RAJESH, P.S.; RAI, V.R. Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013, 2, 120–124. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113000108>. Acesso em: 10 set. 2022.

RAJESWARI, G.; JACOB, S. Deciphering the aloe vera leaf rind as potent feedstock for bioethanol through enzymatic delignification and its enhanced saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111876, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669019308866>. Acesso em: 13 jun. 2022.

REYES, Y.A. et al. Thermochemical conversion processes of *Dichrostachys cinerea* as a biofuel: A review of the Cuban case. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 160, p. 112322, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032122002362>. Acesso em: 30 abr. 2022.

REZANIA, Shahabaldin et al. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: an overview. **Energy**, v. 199, p. 117457, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544220305648>. Acesso em: 18 jul. 2022.

ROCHA-MARTÍN, Javier et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover and sugar cane straw by laccases. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 88-91, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511317318548>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SAINI, Sonu et al. Development of an eco-friendly deinking process for the production of bioethanol using diverse hazardous paper wastes. **Renewable Energy**, v. 146, p. 2362-2373, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960148119312741>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SANKAR, Muthuvelu K. et al. Development of co-immobilized tri-enzyme biocatalytic system for one-pot pretreatment of four different perennial lignocellulosic biomass and evaluation of their bioethanol production potential. **Bioresource technology**, v. 269, p. 227-236, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852418311957>. Acesso em: 07 mai. 2022

SANTOS, M.F.C. **Estudo químico dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados a espécie vegetal *Hacornia speciosa* (Apocinaceae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Sergipe. São Cristóvão, SE, 2011. Disponível em:

https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/6151/1/MARIO_FERREIRA_CONCEICAO_SANTOS.pdf. Acesso em: 10 set. 2022.

SAWARKAR, Ashish N. et al. Bioethanol from various types of banana waste: A review. **Bioresource Technology Reports**, p. 101092, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X22001499>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SCHUTTE, G.R.; BARROS, P.S. **A geopolítica do etanol**. 2010. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br>. Acesso em: 14 abr. 2022.

SCHWIETZKE, Stefan et al. Ethanol production from maize. In: **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 347-364. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-68922-5_23. Acesso em: 12 jul. 2022.

SHANMUGAM, Sabarathinam et al. Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified thermostable laccase from *Trichoderma asperellum* strain BPLMBT1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 7, p. 3618-3628, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S036031991830051X>. Acesso em: 14 abr. 2022.

SHERPA, K. C.; GHANGREKAR, M.M.; BANERJEE, R. A green and sustainable approach on statistical optimization of laccase mediated delignification of sugarcane tops for enhanced saccharification. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 700-709, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718303827>. Acesso em: 10 abr. 2022.

SILVA, B.M.; DA SILVA, W.S.D. Um panorama da implantação do etanol de 3ª geração como uma fonte de energia sustentável. **Engevista**, v. 21, n. 1, p. 176-192, 2019. Disponível em: <https://periodicos.uff.br/engevista/article/view/13289>. Acesso em: 07 mai. 2022

SILVA, Josué José da et al. Produção de laccase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 2012. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-681434>. Acesso em: 07 set. 2022

SONEGO, J. L. S. et al. Extractive Batch Fermentation with CO₂ Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552–7559, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ef5018797>. Acesso em: 10 set. 2022.

SUMAN, Sunil K. et al. Jute sticks biomass delignification through laccase-mediator system for enhanced saccharification and sustainable release of fermentable sugar. **Chemosphere**, v. 286, p. 131687, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521021597#:~:text=Lignin%20component%20in%20jute%20stick%20is%20reduced%20by%201.8%25%20in,enhanced%20saccharification%20after%20lignin%20removal>. Acesso em: 10 abr. 2022.

UDOP: União Nacional da Bioenergia, 2022. Disponível em: [https://www.udop.com.br/noticia/2022/05/04/brasil-devera-produzir-31-a-mais-de-etanol-de-milho-na-safra-2022-23.html#:~:text=Na%20safra%202021%2F22%2C%20o,de%20Economia%20Agropecu%C3%A1ria%20\(Imea\)](https://www.udop.com.br/noticia/2022/05/04/brasil-devera-produzir-31-a-mais-de-etanol-de-milho-na-safra-2022-23.html#:~:text=Na%20safra%202021%2F22%2C%20o,de%20Economia%20Agropecu%C3%A1ria%20(Imea).). Acesso em: 07 set. 2022

WISE, L.E.M.; MURPHY, A.A.D. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicellulose. **Paper Trade Journal**, v. 122, n. 2, p. 35–43, 1946. Disponível em: <http://www.worldcat.org/title/chlorite-holocellulose-its-fractionation-and-bearing-on-summative-wood-analysis-and-studies-on-the-hemicelluloses/oclc/708721051>. Acesso em: 03 jul. 2022.

TAHA, Mohamed et al. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 190-197, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166916300350>. Acesso em: 19 jun. 2022.

TAPPI, Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Official Test Methods, Provisional Test Methods, and Useful Test Methods – Fibrous Materials and Pulp Testing, Atlanta, USA, Np, 1979.

THAKUR, Abhinay et al. Suppressing inhibitory compounds by nanomaterials for highly efficient biofuel production: A review. **Fuel**, v. 312, p. 122934, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121027952>. Acesso em: 30 abr. 2022.

THANIGAIVEL, S. et al. Engineering strategies and opportunities of next generation biofuel from microalgae: A perspective review on the potential bioenergy feedstock. **Fuel**, v. 312, p. 122827, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121026909>. Acesso em: 30 abr. 2022.

VIDAL, Maria de F. **Produção e uso de biocombustíveis no Brasil**. 2019. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/630/1/2019_CDS_79.pdf. Acesso em: 07 mai. 2022.

WYMAN, Charles. Handbook on bioethanol: production and utilization. **CRC press**, 1996. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=KziEzu--D7oC&oi=fnd&pg=PR13&dq=WYMAN,+Charles.+Handbook+on+bioethanol:+production+and+utilization.+CRC+Press,+1%C2%AA+ed.+E-book,+2018.&ots=FYSpnovE8d&sig=BVrxasqJwsHpuCX-5O9HwzVxHtE#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 07 mai. 2022.

YUAN, Hua-wei et al. Potential for reduced water consumption in biorefining of lignocellulosic biomass to bioethanol and biogas. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 131, n. 5, p. 461-468, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172320304667>. Acesso em: 30 mai. 2022.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032116304695>. Acesso em: 19 jun. 2022.

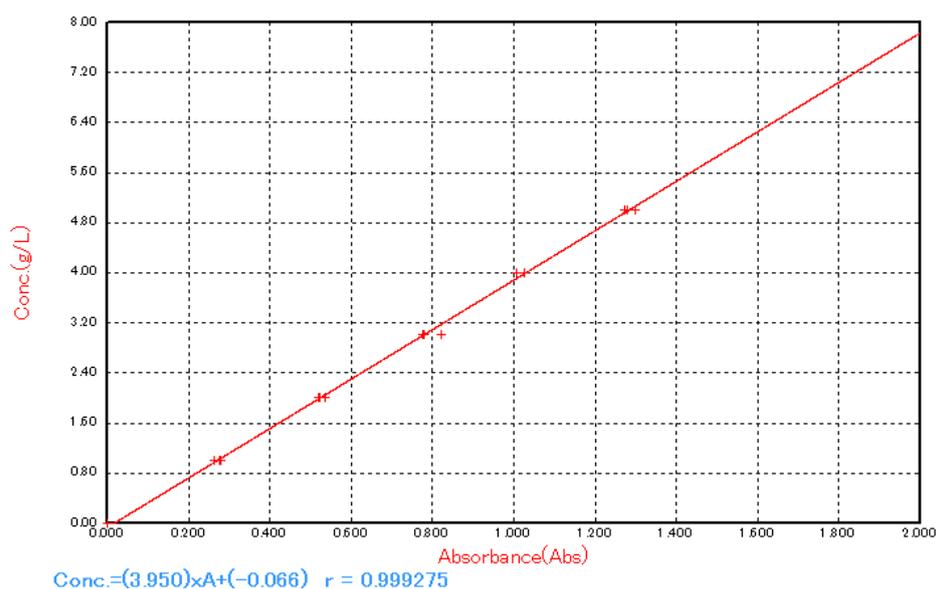
ZABERMAWI, Nidal M. et al. New eco-friendly trends to produce biofuel and bioenergy from microorganisms: An updated review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2022. Disponível em: New eco-friendly trends to produce biofuel and bioenergy from microorganisms: An updated review - ScienceDirect. Acesso em: 30 abr. 2022.

APÊNDICES

APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE A HIDRÓLISE

Na figura 30 está descrita a curva de calibração utilizada durante a quantificação de açúcares fermentescíveis e, na tabela 13 os dados de concentração de açúcares obtidos durante a hidrólise.

Figura 30 – Curva de calibração para quantificação de açúcares



Fonte: Autor

Tabela 13 – Concentração de açúcares X tempo de hidrólise

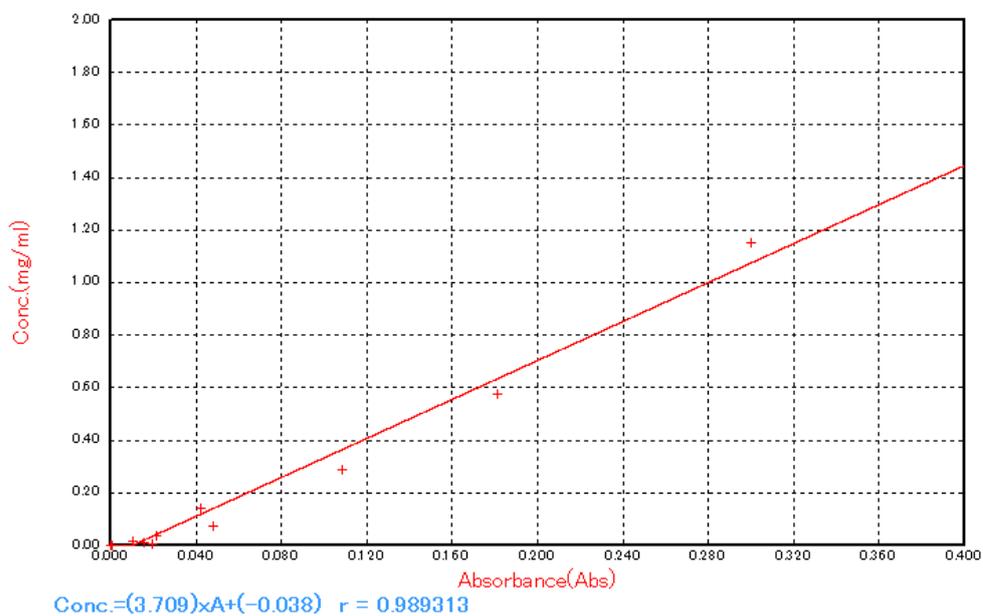
| Tempo (h) | Concentração de açúcares fermentescíveis (g.L ⁻¹) |
|-----------|---|
| 2 | 17,5 |
| 4 | 18,7 |
| 8 | 21,1 |
| 12 | 25,1 |
| 24 | 30,5 |
| 36 | 31,1 |
| 48 | 32,7 |
| 72 | 31,0 |
| 96 | 31,2 |

Fonte: Autor

APÊNDICE B – DADOS REFERENTES A CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Na figura 31 está descrita a curva de calibração utilizada para a dosagem de proteínas

Figura 31 – Curva de calibração para dosagem de proteínas

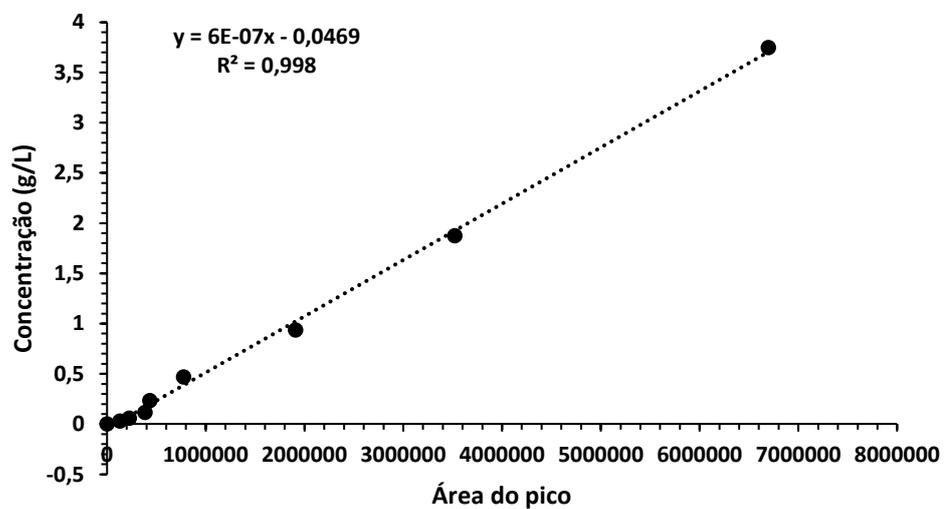


Fonte: Autor

APÊNDICE C – DADOS REFERENTES AO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Na figura 32 está descrita a curva de calibração utilizada durante a etapa de avaliação da concentração de etanol após o processo de fermentação por diferentes tempos.

Figura 32 – Curva de calibração para quantificação de etanol



Fonte: Autor