**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

CLEILTON SANTOS LIMA

**Produção de etanol celulósico por *Spathaspora passalidarum* a partir do bagaço de
cana-de-açúcar: estratégia para melhorar fermentabilidade e estudo do perfil
metabólico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico**

**Lorena
2019**

CLEILTON SANTOS LIMA

Produção de etanol celulósico por *Spathaspora passalidarum* a partir do bagaço de cana-de-açúcar: estratégia para melhorar fermentabilidade e estudo do perfil metabólico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Concentração de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha

Co-orientadora: Profa. Dra. Inês Conceição Roberto

Versão Corrigida

**Lorena
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Cleilton Santos

Produção de etanol celulósico por *Spathaspora passalidarum* a partir do bagaço de cana-de-açúcar: estratégia para melhorar fermentabilidade e estudo do perfil metabólico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico / Cleilton Santos Lima; orientador George Jackson de Moraes Rocha; co orientador Inês Conceição Roberto - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
184 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Bioetanol. 2. Desacetilação alcalina. 3. Inibidores. 4. Metabolômica. 5. *Spathaspora passalidarum*. I. Título. II. Rocha, George Jackson de Moraes, orient. III. Roberto, Inês Conceição, co orient.

Dedico este trabalho, primeiramente, a toda comunidade científica que luta incansavelmente para resoluções de problemas diários, e aos meus pais e irmãos, pelo apoio, amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Marlene Santos Lima e Ivonilson Lima, pelo amor, incentivo e compreensão;

À minha queridíssima noiva Diana de Souza Carvalho, pela paciência e apoio incondicional nesses quatro anos de Doutorado;

Aos meus irmãos Crispiniano Santos Lima, Iranildo Santos Lima, Adenilson Santos Lima, Cassia Santos Lima, Ildete Santos Lima e Crispin Santos Lima, pelo apoio e incentivo;

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha, pela orientação, paciência e ensinamentos;

À Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela co-orientação, paciência e ensinamentos;

Ao Dr. Carlos Driemeier pelo suporte e colaboração durante a primeira etapa do projeto (desacetilação da biomassa);

À Profa. Dra. Jaciane Lutz Inczak, pelo suporte e colaboração tanto no fornecimento da levedura quanto nas valiosas sugestões durante a etapa de fermentação;

Ao Prof. Dr. Leandro Vieira dos Santos, pelas valiosas sugestões e motivação durante a etapa da metabolômica;

Aos meus colegas Lucas de Souza Lopes e Thiago Neitzel, pela ajuda na montagem e retirada dos experimentos das fermentações;

Ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), pelo suporte e espaço cedido para execução dos experimentos;

Aos meus amigos do LNBR, em especial Gabriela Felix Persinoti, Lucas de Souza Lopes, Thiago Neitzel e Karen Cristina Collograi, pela amizade e companheirismo;

Aos meus colegas da central analítica Roger, Renan Pirolla, André e Livia, pelo esforço e paciência durante as análises de todo material da tese;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

Aos meus velhos e novos amigos pelo apoio, ajuda e companheirismo;

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, pelos momentos bons compartilhados;

Aos professores do PPGBI, pelos conhecimentos transmitidos e a Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade de formação e vivência em um ambiente de alto nível de ensino;

Obrigado a todos, sem vocês a execução desse trabalho não seria possível.

RESUMO

LIMA, C.S. **Produção de etanol celulósico por *Spathaspora passalidarum* a partir do bagaço de cana-de-açúcar: estratégia para melhorar fermentabilidade e estudo do perfil metabólico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico**. 2019. 184 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O presente trabalho teve como objetivo principal alcançar progressos científicos no processo de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a estratégia de desacetilação alcalina para melhorar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico e a metabolômica como ferramenta para avaliar a influência dos inibidores durante conversão dos açúcares a etanol por *Spathaspora passalidarum*. Além disso, foi também objetivo dessa tese avaliar as alterações químicas e morfológicas em bagaço e palha de cana-de-açúcar durante etapa de otimização das condições alcalinas. As etapas de desacetilação (NaOH) do bagaço e da palha de cana-de-açúcar foram executadas em escala laboratorial com delineamento experimental 2^3 , variando as concentrações de NaOH (0,1; 0,4 e 0,7 %), temperatura (55, 70 e 85 °C) e tempo (1, 3 e 5 h), sendo avaliado rendimento, composição química e parâmetros nanoestruturais na biomassa. Posteriormente, a condição otimizada de desacetilação (0,4 % m/v NaOH, 70 °C, 3 h), apenas do bagaço, foi executada em escala piloto no LNBR e em seguida pré-tratado em ácido diluído (0,5 % v/v H₂SO₄, 140 °C, 15 min) para obtenção do hidrolisado hemicelulósico. Seguidamente, foram realizadas as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos em biorreator com *S. passalidarum* e avaliação da influência dos inibidores durante conversão dos açúcares a etanol com metabolômica. Quanto aos resultados em escala laboratorial, o tratamento alcalino removeu 90 % dos grupos acetilas e entre 20-30 % da lignina do bagaço e da palha, enquanto que a remoção de 20 % de xilana e de glucana é observada apenas na palha, mas não no bagaço. Considerando as alterações em nanoescala, nem a cocristalização da celulose, nem a formação de agregados de lignina são observados após os tratamentos alcalinos. Além disso, a termoporometria calorimétrica, bem como as microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão, mostraram uma notável abertura dos poros em nanoescala e o afrouxamento das estruturas da parede celular e consequentemente dos tecidos. A etapa de desacetilação alcalina do bagaço de cana antes do pré-tratamento em ácido diluído resultou no aumento de 12 vezes na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico (1,3-18,0 g.L⁻¹) e melhora de 16 % na digestibilidade enzimática da glucana. Além disso, análises com metabolômica em *S. passalidarum* durante 12 horas de fermentação de hidrolisado hemicelulóliso relataram drásticas mudanças no metabolismo dos aminoácidos e das purinas, redução de fluxo na via das pentoses, glicólise e menores níveis de intermediários do ciclo de krebs, como resposta celular aos múltiplos inibidores. Ademais, os inibidores promoveram uma resposta global no metabolismo, afetando a homeostase energética e balanço redox, traduzidos nos menores níveis de ATP e NADPH. Em última análise, essa tese contribuiu com conhecimento sobre o contraste em nível químico e morfológico entre palha e bagaço de cana, obtenção de hidrolisado fermentescível sem necessidade de etapa clássica de detoxificação e com glucana mais digerível; assim como, a compreensão geral da influência dos inibidores durante produção de etanol por *S. passalidarum*.

Palavras-chave: Bioetanol. desacetilação alcalina. inibidores. metabolômica. *Spathaspora passalidarum*.

ABSTRACT

LIMA, C.S. **Cellulosic ethanol production by *Spathaspora passalidarum* from sugarcane bagasse: strategy to improve the fermentability and study of metabolic profiling during fermentation of hemicellulosic hydrolysate**. 2019. 184 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The general objective of this work was to achieve scientific advances in process of cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse using the alkaline deacetylation strategy to improve the fermentability of hemicellulosic hydrolysate and the metabolomics as a tool to evaluate the influence of the inhibitors during conversion of sugars to ethanol by *Spathaspora passalidarum*. Furthermore, was also evaluated the chemical and morphological alterations in sugarcane bagasse and straw submitted to alkaline treatments. Initially, alkaline solutions for deacetylation (0.4 % w/v NaOH, 70 °C, 3 h) as well as proximal conditions (0.1–0.7 % NaOH, 55–85 °C, 1–5 h) chosen by 2³ experimental design were evaluated. Subsequently, the optimized deacetylation condition (0.4 % w/v NaOH, 70 °C, 3 h), only for bagasse, was performed on a pilot plant scale up in LNBR and then pretreated in dilute acid (0.5 % v/v H₂SO₄, 140 °C, 15 min) to obtain the hemicellulosic hydrolysate. Next, the fermentations of hemicellulosic hydrolysates in bioreactor by *S. passalidarum* and influence of the inhibitors during conversion of the sugars to ethanol with metabolomic analysis were evaluated. Regarding laboratory scale results, the deacetylation treatment removes ~90 % of the acetyl groups and 20–30 % of the lignin from both bagasse and straw, while removal of ~20 % of the xylan and glucan is observed in straw, but not in bagasse. Considering nanoscale structural alterations, neither cellulose cocrystallization nor formation of lignin aggregates are observed after the alkaline conditions. Furthermore, calorimetric thermoporometry as well as scanning and transmission electron microscopies show substantial introduction of nanoscale porosity and loosening of the tissue and cell wall structures. Alkaline deacetylation step in sugarcane bagasse prior to pretreatment in dilute acid resulted in a 12-fold increase in ethanol production from hemicellulosic hydrolysate (1.3–18.0 g.L⁻¹) as well as 16 % in enzymatic digestibility of glucan. Moreover, metabolomic analysis in *S. passalidarum* during 12 hours of fermentation in hemicellulosic hydrolysate showed drastic changes in amino acid and purine metabolism, low flux in pentose phosphate and glycolysis pathways as well as a reduced in TCA cycle intermediates as a cellular response to the multiple inhibitors. In addition, the inhibitors promoted a global response in metabolism, affecting energy homeostasis and redox balance, translated into the lower levels ATP and NADPH. Ultimately, this thesis contributed knowledge on chemical and morphological contrast between sugarcane straw and bagasse, obtaining a fermentable hydrolysate without need for a classical detoxification step and with a digestible glucan fraction as well as a general understanding on the influence of the inhibitors during bioethanol production by *S. passalidarum*.

Keywords: Alkaline deacetylation. bioethanol. inhibitors. metabolomics. *Spathaspora passalidarum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Morfologia da cana-de-açúcar.....	22
Figura 1.2 - Estrutura e composição geral da biomassa lignocelulósica.....	26
Figura 1.3 - Estrutura empírica da xilose isolada do bagaço (A) e da palha (B) de cana-de-açúcar.....	26
Figura 1.4 - Modelo hipotético da arquitetura da parede celular vegetal.....	27
Figura 1.5 - Esquema para análise do material lignocelulósico por difração de raios X.....	30
Figura 1.6 - Reprodução sexuada e assexuada de <i>Spathaspora passalidarum</i>	34
Figura 1.7 - Principais mecanismos de absorção da xilose em leveduras descrita na literatura.....	36
Figura 1.8 - Assimilação de pentoses pelo metabolismo microbiano por oxidoredutases e isomerases.....	38
Figura 1.9 - Hidrólise de polissacarídeos em meio ácido.....	43
Figura 1.10 - Furfural e HMF formados durante pré-tratamento em meio ácido.....	44
Figura 1.11 - Reação de condensação da lignina em meio ácido.....	44
Figura 1.12 - Esquema de várias rotas para formação e liberação de inibidores de fermentação em biomassas.....	46
Figura 1.13 - Fluxograma do experimento em escala laboratorial.....	56
Figura 1.14 - Fluxograma do experimento em escala piloto.....	67

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Espectros infravermelhos do bagaço e da palha de cana-de-açúcar no material bruto e desacetilado na condição ponto central (de-Ac).....	95
Figura 2.2 - Composição química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar após várias condições de extração alcalina com NaOH.....	98
Figura 2.3 - Difração de raios X da biomassa bruta e após tratamento com NaOH.....	100
Figura 2.4 - Conteúdo de umidade do bagaço (a) e da palha (b) bruta e após tratamento alcalino no ponto central.....	101

Figura 2.5 - Perfis de água confinada congelável (FBW) antes e após desacetilação (de-Ac) do bagaço (a) e da palha (b).....	102
---	-----

Figura 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tecido vascular do bagaço e da palha antes e após desacetilação (de-Ac).....	104
--	-----

Figura 2.7 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da parede celular secundária do tecido vascular do bagaço antes (A) e após tratamento de desacetilação (B e C).....	105
--	-----

CAPÍTULO 2.1

Figura 2.1.1 – Efeito da desacetilação alcalina sobre a hidrólise enzimática da glucana do bagaço de cana-de-açúcar.....	119
--	-----

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 - Fluxograma do processo usado para produção de bioetanol por <i>S. passalidarum</i>	125
---	-----

Figura 3.2 - Diagrama de blocos do processo de desacetilação (→): desacetilação, pré-tratamento, evaporação e fermentação; e sem desacetilação (-▶): pré-tratamento, evaporação e fermentação.....	130
--	-----

Figura 3.3 - Consumo dos açúcares e produção de bioetanol por <i>S. passalidarum</i> em hidrolisado obtido pelo processo 1 (A) e 2 (B).....	134
---	-----

Figura 3.4 - Porcentagem de viabilidade celular (A) e brotamento (B) durante 60 h de fermentação de hidrolisado obtido pelo processo 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado)...	136
---	-----

Figura 3.5 - Produção de ácido acético, glicerol e xilitol por <i>S. passalidarum</i> durante fermentação de hidrolisado desacetilado (A) e não desacetilado (B).....	138
---	-----

Figura 3.6 - Balanço de massa para desacetilação, pré-tratamento e fermentação nos diferentes processos usados para produção de etanol.....	142
---	-----

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 - Viabilidade (A e B) e brotamento celular (C e D) durante as 72 horas de fermentação de hidrolisado HE e HC por <i>S. passalidarum</i>	155
--	-----

Figura 4.2 - Perfil do consumo de glicose e xilose por <i>S. passalidarum</i> em hidrolisado HE (A) e hidrolisado HC (B)	156
--	-----

Figura 4.3 - Capacidade de bioconversão de inibidores por <i>S. passalidarum</i> durante fermentação de hidrolisado HE (A e B) e HC (C e D).....	157
--	-----

Figura 4.4 - Diferenças entre os tratamentos analisado por PLS-DA.....	158
--	-----

Figura 4.5 - Análise de impacto de vias em <i>S. passalidarum</i> durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico.....	159
--	-----

Figura 4.6 - Heatmap dos metabólitos alterados em <i>S. passalidarum</i> durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico no período adaptativo.....	160
Figura 4.7 - Potenciais biomarcadores em <i>S. passalidarum</i> associados ao estresse por inibidores durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico.....	163
Figura 4.8 - Mecanismo geral proposto para tolerância de <i>S. passalidarum</i> aos múltiplos inibidores.....	167

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - Produção de etanol a partir das fermentações das pentoses usando biomassa lignocelulósica na literatura.....	40
Tabela 1.2 - Desacetilação alcalina (NaOH) executada na literatura.....	47
Tabela 1.3 - Alterações no metabolismo de leveduras na presença de inibidores avaliadas por endometabolômica.....	52

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Condições de tratamento escolhido por desenho experimental fatorial 2 ³ e percentual de solubilização determinado gravimetricamente.....	94
Tabela 2.2 - Composição química (% , m/m) do bagaço e da palha de cana-de-açúcar bruta e desacetilada (de-Ac) dada como porcentagem de matéria seca.....	97

CAPÍTULO 2.1

Tabela 2.1.1 – Composição química (% , m/m), rendimento e solubilização nas etapas de apenas pré-tratamento em ácido diluído (0,5 % H ₂ SO ₄ ; 140 °C; 15 min) e desacetilação + pré-tratamento ácido (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h → 0,5 % H ₂ SO ₄ ;140 °C; 10, 15 e 20 min).....	116
Tabela 2.1.2 – Caracterização do hidrolisado obtido por apenas pré-tratamento em meio ácido (0,5 % H ₂ SO ₄ ;140 °C; 15 min) e desacetilação + pré-tratamento ácido (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h → 0,5 % H ₂ SO ₄ ; 140 °C; 10, 15 e 20 min)	116

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Composição química (% , m/m) do bagaço bruto, apenas desacetilado, desacetilado+pré-tratamento ácido, apenas pré-tratamento ácido e rendimento de todas as etapas.....	131
Tabela 3.2 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo processo 1(desacetilação) e processo 2 (não desacetilado)	131
Tabela 3.3 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo processo 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado) após diluição para fermentação.....	133
Tabela 3.4 - Parâmetros cinéticos das fermentações por <i>S. passalidarum</i> dos hidrolisados obtidos pelos processos 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado) em 60 horas.....	137

Tabela 3.5 - Produção de etanol por leveduras nativas em hidrolisado (detoxificado ou não detoxificado) obtido por pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em ácido sulfúrico diluído.....	139
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 - Parâmetros cinéticos das fermentações por <i>S. passalidarum</i> dos hidrolisados HE e HC em 72 horas.....	156
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Etanol de 1 ^a geração
2G	Etanol de 2 ^a geração
ADH	Álcool desidrogenase
araA	L-arabinose isomerase
araB	L-ribuloquinase
araD	L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase
ArdA	Arabinose redutase
CBios	Mercado de créditos de descarbonização
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
COP 21	21 ^a Conferência das partes da convenção-quadro das nações unidas sobre mudança do clima
de-Ac	Desacetilação
DHAP	Di-hidroxiacetona-fosfato
DRX	Difração de raios X
FTIR	Espectroscopia por infravermelho com transformação de Fourier
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC-MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
GEE	Gases de efeito estufa
HC	Hidrolisado controle
HE	Hidrolisado estratégia
KEGG	do inglês, kyoto encyclopedia of genes and genomes
LAD	Arabitol-4-desidrogenase
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrômetro de massa
LNBR	Laboratório nacional de biorrenováveis
LXR	L-xilulose redutase
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PCA	Análises dos componentes principais
PDC	Piruvato descarboxilase
PLS-DA	Análise discriminante por quadrados mínimos parciais
RenovaBIO	Política nacional de biocombustíveis
ROC	do inglês, receiver operating characteristic
SDV	Sorção dinâmica de vapor
SUCRE	do inglês, sugarcane renewable electricity
TA	Transaldolases
TCDV	Termoporometria por calorimetria diferencial de varredura
TK	Transcetolases
ÚNICA	União da indústria de cana-de-açúcar
XDH	Xilitol desidrogenase
XI	Xilose isomerase
XK	Xilulose quinase
XR	Xilose redutase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA E METODOLOGIA

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Cana-de-açúcar no Brasil	21
2.2	Estrutura da cana-de-açúcar e potencial energético	22
2.3	Composição química e arranjo estrutural da parede celular do bagaço e da palha de cana-de-açúcar	24
2.4	Estudos nanoestruturais em biomassa lignocelulósica	27
2.4.1	Termoporometria	28
2.4.2	Sorção dinâmica de vapor	29
2.4.3	Difração de raios-X	29
3	BIOCOMBUSTÍVEIS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	30
3.1	Importância econômica da hemicelulose	32
3.2	Potencial biotecnológico de leveduras não convencionais	32
3.3	Ecologia e fisiologia de <i>Spathaspora passalidarum</i>	33
3.4	Metabolismo de leveduras que fermentam pentoses	35
3.5	Produção de etanol pela fermentação de hidrolisado hemicelulósico	39
4	PRÉ-TRATAMENTO	41
4.1	Reações de carboidratos e lignina em meio ácido	42
4.2	Produtos de degradação oriundos de pré-tratamento em meio ácido e alcalino	45
5	ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE INIBIDORES E ESTUDOS	46
5.1	Desacetilação alcalina	46
5.2	Metabolômica aplicada à bioenergia	49
5.3	Preparo da amostra e análise por GC-MS e LC-MS em leveduras	49
5.4	Endometabolômica e estudos de inibidores	51
6	OBJETIVOS	55
6.1	Geral	55
6.2	Específicos	55
7	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	56
7.1	Procedimentos em escala laboratorial	56
7.1.1	Obtenção do bagaço e da palha de cana-de-açúcar	56
7.1.2	Reação com hidróxido de sódio (NaOH)	57
7.1.3	Composição química da biomassa	58
7.1.4	Determinação física da biomassa	63
7.1.4.1	Espectroscopia por infravermelho	63
7.1.4.2	Difração de raios-X	63
7.1.4.3	Sorção dinâmica de vapor	64
7.1.4.4	Termoporometria	64
7.1.5	Pré-tratamento em meio ácido do bagaço desacetilado e não desacetilado	65
7.1.6	Hidrólise enzimática do material pré-tratado	66
7.2	Procedimentos em escala piloto	67
7.2.1	Obtenção do hidrolisado hemicelulósico e fermentação	67

7.2.1.1 Desacetilação do bagaço e pré-tratamento com H ₂ SO ₄	67
7.2.1.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico e caracterização	68
7.2.1.3 Obtenção do isolado e identificação molecular	68
7.2.1.4 Microrganismo e preparo do inóculo	69
7.2.1.5 Propagação	69
7.2.1.6 Fermentação	70
7.2.1.6.1 Procedimentos analíticos	70
7.2.1.6.2 Determinação de massa seca.....	70
7.2.1.6.3 Viabilidade e brotamento.....	71
7.2.1.6.4 Análise de metabólitos.....	71
7.2.1.6.5 Cálculos dos parâmetros cinéticos	71
7.2.1.7 Endometabolômica e ponto de coleta	72
7.2.1.8 Amostragem, quenching e extração	72
REFERÊNCIAS.....	73

CAPÍTULO 2 - ALTERAÇÕES MULTIESCALA EM BAGAÇO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS A DESACETILAÇÃO ALCALINA

1 INTRODUÇÃO	87
2 MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Biomassa.....	89
2.2 Tratamento alcalino	89
2.3 Determinação da porcentagem de solubilização.....	90
2.4 Composição da biomassa.....	90
2.5 Espectroscopia por infravermelho	91
2.6 Difração de raios-X.....	91
2.7 Sorção dinâmica de vapor	92
2.8 Termoporometria colorimétrica	92
2.9 Microscopia eletrônica de varredura.....	92
2.10 Microscopia eletrônica de transmissão	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	93
3.1 Solubilização da biomassa promovida pelo tratamento alcalino	93
3.2 Identificação dos componentes solubilizados	94
3.3 Ausência de cocristalização da celulose	99
3.4 Alteração na camada de hidratação	101
3.5 Abertura de poros em nanoescala	102
3.6 Ausência de agregados de lignina.....	103
3.7 Visualização de tecidos e da parede celular.....	103
3.8 Diferenças entre bagaço e palha	106
3.9 Relação entre alterações químicas e morfológicas	106
3.10 Desacetilação alcalina comparado ao pré-tratamento hidrotérmico	107
4 CONCLUSÕES	108
AGRADECIMENTOS	109
REFERÊNCIAS.....	109

CAPÍTULO 2.1 – GANHO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PELA ADIÇÃO DA ESTRATÉGIA DE DESACETILAÇÃO ALCALINA

1 MATERIAL E MÉTODOS	114
1.1 Pré-tratamento em meio ácido do bagaço desacetilado e não desacetilado	114
1.2 Hidrólise enzimática do material pré-tratado	114
2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	115
2.1 Otimização do pré-tratamento em ácido diluído do material desacetilado	115
2.2 Ganho na hidrólise enzimática pela adição da desacetilação alcalina	118
REFERÊNCIAS	120

CAPÍTULO 3 - AUMENTO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *SPATHASPORA PASSALIDARUM* A PARTIR DE HIDROLISADO DESACETILADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

1 INTRODUÇÃO	123
2 MATERIAL E MÉTODOS	124
2.1 Preparo do hidrolisado hemicelulósico	124
2.2 Rendimento e composição química do bagaço	126
2.3 Obtenção do isolado e preparo do inóculo	126
2.4 Propagação	127
2.5 Fermentação	127
2.6 Procedimentos analíticos	128
2.6.1 Determinação de massa seca	128
2.6.2 Viabilidade celular e brotamento	128
2.6.3 Análise de metabólitos	128
2.6.4 Cálculos dos parâmetros cinéticos	129
2.7 Análise estatística	129
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	129
3.1 Comparação da fração sólida e líquida gerada durante desacetilação (processo 1) e sem desacetilação (processo 2)	129
3.2 Melhora na produção de etanol por <i>S. passalidarum</i> no hidrolisado desacetilado (processo 1)	133
3.3 Desempenho fermentativo no hidrolisado desacetilado e não desacetilado	137
4 CONCLUSÕES	143
AGRADECIMENTOS	143
REFERÊNCIAS	143

CAPÍTULO 4 – PERFIL METABÓLICO NO PERÍODO ADAPTATIVO DE *SPATHASPORA PASSALIDARUM* AOS MÚLTIPLOS INIBIDORES DURANTE FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

1 INTRODUÇÃO	149
2 MATERIAL E MÉTODOS	150
2.1 Reagentes e padrões	150
2.2 Microrganismo e identificação molecular	151
2.3 Inóculo e propagação	151
2.4 Preparo do hidrolisado hemicelulósico	152
2.5 Fermentação	152
2.6 Preparo da amostra	153

2.6.1 Amostragem, quenching e extração.....	153
2.6.2 Análise de metabólito intracelular por LC-MS.....	153
2.6.3 Determinação extracelular de inibidores, açúcares e etanol	153
2.6.4 Análise estatística	154
3 RESULTADOS	154
3.1 Efeito fisiológico dos inibidores durante fermentação de hidrolisado	154
3.2 Redução da produção de etanol durante fermentação de hidrolisado.....	155
3.3 Capacidade de biodetoxificação de inibidores.....	157
3.4 Resposta global do metabolismo aos inibidores	158
3.4.1 Análise de impacto de vias	158
3.5 Resposta específica do metabolismo aos inibidores	159
3.6 Identificação de potenciais biomarcadores	162
4 DISCUSSÕES	163
5 CONCLUSÕES	167
AGRADECIMENTOS	168
REFERÊNCIAS.....	168
CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	172
APÊNDICE A: Tabela 1 - Composição química (% , m/m) do bagaço de cana-de-açúcar após várias condições de desacetilação alcalina.....	174
APÊNDICE B: Tabela 2 - Composição química (% , m/m) da palha de cana-de-açúcar após várias condições de desacetilação alcalina.....	175
APÊNDICE C: Paper I - Multiscale alterations in sugar cane bagasse and straw submitted to alkaline deacetylation.....	176

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundante no planeta Terra com potencial para produção de biocombustíveis, como alternativa para substituir em parte a demanda global por combustíveis fósseis e reduzir os gases de efeito estufa (THORNLEY et al., 2015; ZABED et al., 2017). Portanto, a produção de bioetanol a partir de biomassas largamente disponíveis, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar no Brasil é importante, sobretudo pela alta produtividade da cana-de-açúcar e sistema de bioenergia consolidado (MANDEGARI; FARZAD; GÖRGENS, 2017; ZABED et al., 2016). Somado a isso, o Brasil assumiu em 2015 um compromisso voluntário na Conferência de Paris (COP21) para reduzir suas emissões de gases de efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global, com definição de metas a serem alcançadas até 2028, tendo como destaque a redução de 43 % das emissões de gases de efeito estufa e participação de 45 % de energias renováveis na matriz energética brasileira (BARROS, 2017). Para atender esses objetivos, foi aprovado no congresso em 2017 a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBIO), que tem como principal foco estimular a produção de biocombustíveis por meio de ativos financeiros, como crédito de descarbonização (CBIO), tendo maior valor de acordo com a menor emissão de gases de efeito estufa pelo processo tecnológico empregado (BRASIL, 2017). Nesse sentido, aumentaram as expectativas em relação aos investimentos na produção de etanol de segunda geração, considerado o biocombustível líquido com menor emissão de gases de efeito estufa (THORNLEY et al., 2015).

Entretanto, para obtenção de sistemas de produção de etanol de segunda geração (2G) sustentáveis e economicamente viável é necessário o aproveitamento integral de todas as frações da biomassa, principalmente celulose, hemicelulose e lignina (SZCZERBOWSKI et al., 2014). A glicose é eficientemente usada pela *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol celulósico, a qual é a levedura mais robusta no processo industrial com hexoses (MOYSÉS et al., 2016). Contudo, a bioconversão de pentoses ainda carece de mais estudos. A conversão de xilose a etanol é essencial, tendo em vista que é o segundo maior açúcar no material lignocelulósico. Entretanto, a xilose não é facilmente utilizada como fonte de carbono em comparação com a glicose pela maioria das leveduras, mas para a *Spathaspora passalidarum*, levedura nativa, tem se observado eficiente fermentação de xilose a bioetanol (CADETE et al., 2016). Porém, a presença de inibidores no hidrolisado hemicelulósico, sobretudo resultante de pré-tratamento em meio ácido, tem interferido na produção de etanol, influenciando na hidrólise enzimática e metabolismo microbiano (HOU; YAO, 2012).

Os produtos de degradação, como ácidos fracos (acético e fórmico), derivados furânicos (hidroximetilfurfural e furfural) e derivados de lignina (vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico e outros), presentes no hidrolisado hemicelulósico liberados ou produzidos durante pré-tratamento em meio ácido, têm sido um entrave na produção de bioetanol (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; VAN DER POL et al., 2014). Tais inibidores podem comprometer a eficiência e produtividade de etanol celulósico (VAN DER POL et al., 2014), tornando necessária a adoção de estratégias para minimizar a inibição e estudos para elucidar seus efeitos.

A desacetilação alcalina acoplada com o pré-tratamento em meio ácido tem sido uma estratégia simples e prática usada na literatura, visando reduzir os níveis de alguns componentes inibitórios no hidrolisado, o que tem melhorado o desempenho fermentativo de vários microrganismos. Tal etapa, executada com palha de milho (CHEN et al., 2012a) e de arroz (CASTRO et al., 2016), tem beneficiado a produção de etanol celulósico, sobretudo pela eficiente remoção de inibidores na biomassa, resultando na redução dos níveis de tais compostos no hidrolisado, especialmente ácido acético (CHEN et al., 2012a, 2012b, 2012c; SHEKIRO III et al., 2016). No entanto, faltam estudos com o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, biomassas com expressiva importância e abundância no estado de São Paulo.

Os efeitos tóxicos dos inibidores têm sido avaliados por transcriptômica (CHEN et al., 2016c), proteômica (LV et al., 2014) e lipidômica (YANG et al., 2012) em *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente, em meio semissintético. Entretanto, faltam estudos com endometabolômica, sobretudo com *Spathaspora passalidarum* no momento de fermentação de hidrolisado hemicelulósico, o qual é rico em múltiplos inibidores e traduz uma situação real de fermentação a etanol 2G. A metabolômica tem sido usada para análise da resposta celular ao estresse com inibidores por meio das alterações dos perfis metabólicos intracelulares, fornecendo informações úteis sobre a relação complexa entre levedura e inibidores (DING et al., 2011a, 2012a; HASUNUMA et al., 2011). Além disso, compreender a resposta intracelular de tal levedura aos inibidores poderá fornecer subsídios para aumentar a tolerância e melhorar a produção de etanol de segunda geração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae e cultivada em diversos países, como EUA, Índia e Brasil, sendo o Brasil país com destaque mundial na produção de cana (MANDEGARI; FARZAD; GÖRGENS, 2017). Tal fato tem sido atribuído a disponibilidade de terras para plantio e concentração do cultivo nas mãos de grandes produtores quando comparado a outros países (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). No Brasil, as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste concentram a maior parte da produção de cana-de-açúcar, sendo o estado de São Paulo detentor da maior produção de cana, açúcar e etanol 1G do país (BAEYENS et al., 2015; MORIYA; GONÇALVES; DUARTE, 2007; UNICA, 2016). A produção total de cana da temporada 2018/19 foi de 620 milhões de toneladas, representando uma redução de 2 % em relação a 2017/18, que terminou em 633 milhões. Com a estratégia das usinas beneficiando o etanol em detrimento ao açúcar, a produção do renovável alcançou 33,14 bilhões de litros, um aumento de 21,7 % ou de 5,9 bilhões de litros ante a safra anterior. O volume representa recorde tanto em relação ao etanol total quando ao hidratado, o máximo encontrado anterior foi de 30,5 bilhões de litros em 2015/16 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar, a cultura representa cerca de 7 milhões em termos de ocupação de área, quando comparada àquelas dedicadas à produção de grãos, como soja e milho com 21 milhões e 14 milhões, respectivamente (UNICA, 2016). Tal fato torna importante a expansão do cultivo de cana-de-açúcar, visando aumentar a produção de açúcar e etanol. Porém, essa maior expansão pode causar danos ambientais relacionados ao desmatamento e com consequente emissão de gases de efeito estufa (ALKIMIM; SPAROVEK; CLARKE, 2015). Uma alternativa a essa problemática é o uso de pastagens sustentáveis para expansão do cultivo (ALKIMIM; SPAROVEK; CLARKE, 2015; EGESKOG et al., 2014).

A cana-de-açúcar possui rotas bem estabelecidas no Brasil, com maior parte da produção direcionada para açúcar e etanol de primeira geração (DIAS et al., 2015). O bagaço é usado para gerar calor e energia elétrica, os quais são utilizados em todo processo de produção de açúcar e etanol de primeira geração (1G)(DIAS et al., 2015). A palha oriunda da cana-de-açúcar não é comumente utilizada no Brasil para essa finalidade, devido ao alto custo de recuperação e implicações no solo a curto e longo prazo (CARDOSO et al., 2013). Entretanto, atualmente, algumas empresas, como a Raízen e a Granbio tem utilizado a palha

e/ou bagaço na produção de etanol de segunda geração (2G) (JANSEN et al., 2017; RAÍZEN, 2018) e projetos desenvolvidos no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), como o SUCRE (SUCRE, do inglês, Sugarcane Renewable Electricity) tem estimulado várias indústrias a utilizar a palha, como complemento ao bagaço na geração de bioeletricidade (LABORATÓRIO NACIONAL DE BIORRENOVÁVEIS, 2017).

Mesmo com esse cenário produtivo, o Brasil ainda carece de melhorias quanto a otimização da produção de cana-de-açúcar, visando potencializar a produção de açúcar e etanol 1G. Os estados brasileiros possuem áreas extensas, o que possibilita o máximo aproveitamento de terras para expansão da plantação de cana-de-açúcar. O aumento na produção global de cana-de-açúcar possibilitará incrementos na produção de açúcar e etanol 1G, bem como proporcionará maior aproveitamento e diversificação de subprodutos a partir do bagaço e da palha.

2.2 Estrutura da cana-de-açúcar e potencial energético

A cana-de-açúcar é composta por colmo e palha (Figura 1.1). O colmo é removido para moagem, visando à obtenção do caldo para produzir açúcar e/ou etanol 1G. O bagaço é o material sólido obtido após moagem do colmo para obtenção do caldo. A palha é composta de folhas verdes, secas e ponteiros, os quais são disponíveis no campo após colheita mecanizada da cana (CANILHA et al., 2012; DIAS et al., 2015).

Figura 1.1 - Morfologia da cana-de-açúcar

O bagaço possui composição de partícula bem heterogênea, dividida em casca, fibra e medula, sendo a fibra e a medula as frações majoritárias. As fibras apresentam-se como conjunto de células rígidas e alongadas enquanto que a medula é formada por partículas esponjosas e finas com formas regulares e esférica com função no acúmulo de açúcar na planta. A casca possui células de tamanho maior com lâminas de tamanho grosseiramente retangulares (REZENDE; PIMENTA, 2015).

Diferente do bagaço que é disponível como resíduo após extração do caldo de cana, a palha de cana-de-açúcar necessita de várias operações agrícolas para seu recolhimento e transporte até a usina. As duas rotas de recolhimento, atualmente, são o transporte da palha junto com a cana picada e o enfardamento após colheita da cana (LABORATÓRIO NACIONAL DE BIORRENOVÁVEIS, 2017). Existem debates científicos sobre a quantidade de palha que deve ser colhida no campo, pois a retirada em excesso poderia afetar a reciclagem de nutrientes no solo, biodiversidade, controle de erosão, armazenamento de água, acúmulo de carbono e controle de erva-daninha (CARVALHO et al., 2017b). Dias et al. (2014) relataram que cerca de 50 % poderia ser coletado do campo sem dano ao solo e ser utilizado para outras finalidades, como produzir eletricidade e/ou etanol 2G. Entretanto, regiões com tipo de clima e solo menos sensível a erosão são menos afetadas pela remoção. Portanto, a quantidade de palha removida deve levar em conta os fatores locais (clima e tipo de solo) (CARVALHO et al., 2017b). Além disso, há necessidade de métodos eficientes de separação de folhas secas e verdes no campo, pois tem sido registrado que folhas verdes (ricas em nutrientes minerais) podem ficar no campo e folhas secas (ricas em celulose, hemicelulos e lignina) podem ser recuperadas e direcionados para outras aplicações (MENANDRO et al., 2017).

Quanto ao potencial energético, parte das unidades sucroalcooleiras do País tem aumentado suas receitas com a comercialização da energia elétrica excedente gerada pela queima do bagaço. Tais avanços são devido as tecnologias para gerar calor e eletricidade serem maduras e comercialmente disponíveis (KHATIWADA et al., 2012). Entretanto, a produção de etanol de segunda geração ainda não tem se tornado uma realidade industrial concreta, devido ao alto custo para produção (JONKER et al., 2015).

O uso do bagaço e da palha de cana para produzir etanol 2G e/ou bioeletricidade depende de vários fatores, geralmente favorecendo a bioeletricidade. Khatiwada et al. (2016) executaram uma análise tecno-econômica, onde a produção de etanol 2G e bioeletricidade a partir do bagaço e da palha poderiam ocorrer simultaneamente sem competição no Brasil. Tal cenário foi possível com aumento do preço da gasolina no EUA e redução do preço da

energia elétrica no Brasil, onde o país exportaria o etanol 2G para EUA e receberia mais investimentos governamentais e indústrias para produção do biocombustível. Somado a isso, Dias et al. (2011) relataram que o uso do bagaço excedente e o incremento da palha para produzir etanol 2G com aproveitamento integral da celulose, hemicelulose e lignina no contexto biorrefinaria poderá tornar o etanol celulósico economicamente viável. De fato, a diversificação de produtos a partir da biomassa é essencial para o estabelecimento de uma biorrefinaria análoga a refinaria de petróleo (KHATIWADA et al., 2016).

2.3 Composição química e arranjo estrutural da parede celular do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

Para determinação acurada da composição química de tais biomassas, o material deve ser bem homogeneizado. Entretanto, mesmo com tal cuidado a composição química pode variar de acordo com os procedimentos agrícolas e indústrias, tipo de solo, forma de colheita e armazenamento, época da coleta e entre outros (CANILHA et al., 2012; HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005). De forma geral, é assumido que a biomassa lignocelulósica é composta por cerca de 40 % de celulose, 30 % de lignina, 25 % de hemicelulose e outros componentes, diferindo na composição de acordo com a biomassa vegetal e outros fatores (tipo de biomassa, tecido da planta e tempo de armazenamento) (SZCZERBOWSKI et al., 2014). No bagaço, tem sido registrado entre 35-55 % de glucana, 16-31 % de hemicelulose, 17-32 % de lignina total, 1-7 % de cinzas totais e 1-10 % de extrativos. Na palha, entre 33-40 % de glucana, 26-30 % de hemicelulose, 10-25 % de lignina total, 2-8 % de cinzas totais e 6-7 % de extrativos (ROCHA et al., 2015a; SZCZERBOWSKI et al., 2014).

A celulose é o biopolímero linear mais abundante encontrado na parede celular dos vegetais, constituído por unidades de D-glicose unidos por ligações glicosídicas (β -1,4 glicose). O arranjo natural das ligações de hidrogênio entre grupos hidroxilas de unidades de glicose permite que o polímero seja organizado em cadeias que se organizam em microfibrilas e por fim em fibras, gerando regiões cristalinas e amorfas (CHEN, 2014). Tais arranjos tornam a celulose um polímero rígido, insolúvel e resistente a depolimerização (MOSIER, 2005b). Técnicas, como a difração de raios X tem sido utilizada para mensurar a cristalinidade da celulose em material bruto e pré-tratado (DRIEMEIER et al., 2011, 2015) (Figura 1.2).

A hemicelulose é um heteropolímero de cadeia curta, amorfo e ramificado. Tal heteropolímero é classificado de acordo com os principais açúcares encontrado na cadeia: xilana, glucomanana e galactana (FENGEL; WEGENER, 1989). Os principais açúcares

encontrados são pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (β -D glicose, α -D galactose e β -D manose). Alguns açúcares ácidos, como glucurônico, galacturônico e metilglucurônico são encontrados, assim como grupos acetilas (CHEN, 2014). Estudos recentes relatam que a hemicelulose em palha e bagaço de cana-de-açúcar pode ser organizada da seguinte maneira: blocos principais de xilana com unidades (β -1,4 xilana)D-xilopirranose com possíveis substituições glicosil no C-1 e/ou C-3 (CARVALHO et al., 2017a). Xilanas são parcialmente acetiladas em L-arabino(4-*O*-metilglucurono)-D xilana (GAX), onde unidades de ácido glucurônico e arabinose são ligados na posição *O*-2 e *O*-3 de blocos de xilana, respectivamente (CARVALHO et al., 2017a) (Figura 1.3).

A lignina é uma macromolécula aromática presente na parede celular, constituída por três unidades básicas: álcool cumarílico, sinapílico e coniferílico, os quais quando polimerizados originam, *p*-hidroxifenil (H), guacil (G) e siringil (S) (TEN; VERMERRIS, 2015) (Figura 1.2). As principais ligações entre essas macromoléculas são β -*O*-4, β -5, β - β , 5-5 e 4-*O*-5 (FENGEL; WEGENER, 1989). Dados recentes mostraram que o bagaço de cana-de-açúcar é rico em unidades siringilas e a palha em guacilas (DEL RÍO et al., 2015a). Além disso, a lignina do bagaço possui muitas ligações β -*O*-4 em relação a palha com mais ligações de condensação, o que sugere uma maior susceptibilidade do bagaço as reações químicas (DEL RÍO et al., 2015a). Estruturalmente, a lignina forma uma barreira natural que impede a acessibilidade de enzimas a celulose e além disso tem sido registrado uma minimização na desativação de enzimas em biomassas deslignificada, pois a lignina pode formar ligações com o sítio ativo (LI; ZHENG, 2017). Portanto, a remoção parcial de lignina pode contribuir com a melhora na hidrólise enzimática.

Figura 1.2 - Estrutura e composição geral da biomassa lignocelulósica

Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

Figura 1.3 - Estrutura empírica da xilose isolada do bagaço (A) e da palha (B) de cana-de-açúcar

Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2017a).

Figura 1.4 - Modelo hipotético da arquitetura da parede celular vegetal

Fonte: Adaptado de Kang et al. (2019).

Modelo recente relatando a estrutura geral da parede celular, sugere que a mesma está organizada da seguinte forma: microfibrilas de celulose ligam-se com cadeias de arabinoxilanas, as quais são esterificadas com fenilpropanóides (ácido ferúlico e *p*-cumárico) a lignina (Figura 1.4). A lignina é mais associada com blocos de xilana e pouco associada aos blocos de celulose. Além disso, a distorção da estrutura da xilana por interações eletrostática pode favorecer a conformação da lignina na parede celular (KANG et al., 2019). Publicações anteriores tem registrado, também, a importância dos fenilpropanóides (ácido *p*-cumárico e ferúlico) na parede celular da cana-de-açúcar, onde estabelecem ligações cruzadas, principalmente, via ligações ésteres entre hemicelulose e éster e éter com a lignina (JU et al., 2011; XU et al., 2005a), fortalecendo esse modelo.

2.4 Estudos nanoestruturais em biomassa lignocelulósica

Para obtenção de carboidratos solúveis a partir da biomassa lignocelulósica visando várias aplicações biotecnológicas, como produção de etanol celulósico, é necessário a desconstrução da biomassa que está organizada em escala hierárquica (CHEN et al., 2014). Parte dessa estrutura hierárquica encontra-se em escala nanométrica e seu estudo é importante para entendimento das mudanças em nanoescala de biomassas submetidas ao pré-tratamento termoquímico (DRIEMEIER, 2017). A biomassa é naturalmente recalcitrante, devido a estrutura rígida e compacta da parede celular, as quais são relacionados diretamente a acessibilidade da área superficial e indiretamente a composição químicas, como barreira de lignina, grau de polimerização e cristalinidade da celulose e

grupos acetilas presente na hemicelulose, bem como a fatores nanoestruturais, como tamanho e volume de poros, tamanho de partícula e área superficial específica (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a).

As principais modificações nanoestruturais observadas em biomassa vegetal submetida ao pré-tratamento termoquímico são aumento dos poros, aumento da cristalinidade da celulose e largura dos cristais (cocrystalização), delaminação e afrouxamento da parede celular, formação de agregados de lignina e alteração no conteúdo de umidade (DRIEMEIER, 2017; DRIEMEIER et al., 2011; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012a). Dentre as técnicas para estudos de alterações em nanoescala na biomassa lignocelulósica, a difração de raios-X, termoporometria e sorção dinâmica de vapor têm ganhado destaque, sobretudo para caracterização de biomassas submetidas ao pré-tratamento termoquímico (DRIEMEIER et al., 2011; DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012; DRIEMEIER; OLIVEIRA; CURVELO, 2016). A seguir são apresentados os princípios das técnicas relatadas.

2.4.1 Termoporometria

Existem várias técnicas para determinação do tamanho e da distribuição dos poros, como intrusão de mercúrio, adsorção e desorção de gás e permeabilidade de gás (ANOVITZ; COLE, 2015). Entretanto, para matérias lignocelulósicas essas técnicas são limitadas, devido à necessidade de material seco, o que proporciona colapso dos poros. A termoporometria por calorimetria diferencial de varredura (TCDV) é um método térmico usada para determinar tamanho e distribuições de poros em material sólido poroso no estado úmido (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). O método tem como princípio para detecção de tamanho e distribuição de poros, que em confinamento nanométrico, as transições de fases da água ocorrem em temperaturas deslocadas para aquelas sem confinamento. O TCDV diferencia três tipos de água conforme sua interação com os poros, 1) água livre (água fora dos poros e com temperatura de fusão a 0 °C); 2) água confinada congelável (água presente dentro dos poros e que são responsáveis pelo deslocamento da temperatura de transição sólido-líquido abaixo de 0 °C) e 3) água não congelável (camada líquida de água que permanece na parede dos poros e na superfície do gelo do interior dos poros, com difícil mensuração). O sinal calorimétrico de derretimento do gelo em cada etapa de aquecimento é convertido para massa de gelo derretido e associado com um diâmetro de poro específico. Tal técnica tem sido aplicada recentemente para caracterização do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento termoquímico (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012;

DRIEMEIER; OLIVEIRA; CURVELO, 2016), ajudando na compreensão das mudanças nanoestruturais provocadas por essa classe de pré-tratamento.

2.4.2 Sorção dinâmica de vapor

A sorção dinâmica de vapor (SDV) é um método térmico que mensura o conteúdo de umidade em equilíbrio na biomassa (SKAAR, 1988). Tal técnica permite estudar a interação da água com a celulose na superfície da biomassa. Diferentemente da termoporometria, a SDV é sensível a primeira camada de hidratação da biomassa enquanto o TCDV é sensível à água em confinamento nos poros. O método gravimétrico se baseia na determinação das massas das amostras em equilíbrio sobre diferentes pressões de vapor de água na etapa de adsorção e dessorção, visando avaliar a velocidade e a quantidade de solvente absorvido pela amostra. A amostra controle é preparada através da modulação entre fluxo de N₂ - sem vapor de água ($h=0$) e vapor de água saturada ($h=1$) (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). Caracterização da biomassa por SDV fornecem muitos parâmetros, como conteúdo de umidade, dados de equilíbrio e cinética que podem refletir as propriedades dos materiais (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). Os dados são ajustados pelo modelo HH – “Hailwood–Horrobin sorption model” (SKAAR, 1988). Diferentes pré-tratamentos podem modificar as propriedades físico-química das biomassas, o que pode ser monitorado por SDV.

2.4.3 Difração de raios X

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais lignocelulósicos (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012; ROCHA et al., 2012a), a técnica de difração de raios-X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas presentes em materiais sólidos cristalinos. A difração de raios X é famosa por ter ajudado na elucidação da estrutura do DNA (WATSON; CRICK, 1953) e estrutura microcristalina de compostos inorgânicos e orgânicos (LOUËR, 2017). Recentemente, tal técnica tem sido importante na determinação da estrutura cristalina da celulose presente em materiais lignocelulósicos de gramíneas, como a cana-de-açúcar (DRIEMEIER et al., 2011, 2015; DRIEMEIER; BRAGATTO, 2013; DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011; DRIEMEIER; FRANCISCO, 2014).

O método tem como princípio que quando um feixe de raios-X monocromático incide sobre um material cristalino, ocorre o fenômeno da difração (DRIEMEIER; FRANCISCO, 2014). Analisando a incidência em um único átomo isolado, os elétrons deste átomo ficarão

excitados e vibrarão com a mesma frequência do feixe incidente e esses elétrons vibrando emitirão raios-X em certas direções com a mesma frequência do feixe incidente, formando ângulos e possibilitando mensurar a distância dos átomos (DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011; OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013). A difração de raios-X fornece informações sobre o arranjo estrutural dos átomos que constituem um sólido, indicando a princípio se a amostra possui características de um sólido cristalino ou amorfo a partir da presença ou ausência de picos no difratograma (DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011). Os padrões de difração bidimensionais são corrigidos e analisados por modelos matemáticos, como CRAFS, o qual, determina vários parâmetros, como largura média dos cristais de celulose, índice de cristalinidade e orientação dos cristais (DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011; OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013). A técnica de análise estrutural por raios-X é aplicada somente a materiais que apresentem de alguma forma periodicidade do arranjo atômico. Esta é a principal limitação da técnica, ou seja, não se aplica a materiais sólidos totalmente amorfos como os vidros ou alguns polímeros e nem a líquidos ou gases (CLEARFIELD; REIBENSPIES; BHUVANESH, 2009).

Figura 1.5 - Esquema para análise do material lignocelulósico por difração de raios X

Fonte: Adaptado de Driemeier e Calligaris (2011).

3 BIOCOMBUSTÍVEIS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A certa escassez das reservas de petróleo somado aos grandes impactos ambientais proporcionado pelas emissões dos gases de efeito estufa (GEE) por tal matriz energética, levaram os governos de vários países a buscarem fontes renováveis e sustentável de energia (HOOGWIJK et al., 2003; PARIKKA, 2004). Os biocombustíveis têm surgido como matriz

energética alternativa com baixa geração de poluentes e de baixo custo. O etanol 1G produzido do caldo de cana-de-açúcar (Brasil) e do milho (EUA) é até o momento o biocombustível com capacidade para atender a demanda mundial crescente por energias renováveis e de baixo custo (GUPTA; VERMA, 2015).

Somado a isso, o Brasil assumiu em 2015 um compromisso voluntário na Conferência de Paris (COP21) para reduzir suas emissões de gases do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global, com definição de metas a serem alcançadas até 2028, com destaque para redução de 43 % das emissões de gases do efeito estufa e participação de 45 % de energias renováveis na matriz energética (BARROS, 2017). Para atender esses objetivos, foi aprovado no congresso em 2017 a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBIO), que tem como principal foco estimular a produção de biocombustíveis por meio de ativos financeiros, como crédito de descarbonização (CBIO) que podem ter valor diferenciado de acordo com o processo de produção (quanto menor o balanço das emissões de gases do efeito estufa da empresa mais crédito de descarbonização) (BRASIL, 2017).

Dessa forma, aumentaram as expectativas em relação aos investimentos na produção de etanol de segunda geração, considerado o biocombustível líquido com menor emissão de gases de efeito estufa (THORNLEY et al., 2015). Nos últimos anos, houve uma redução nos números de empresas interessadas na produção de etanol celulósico em escala comercial, devido a problemas tecnológicos (MARQUES, 2018). Entretanto, recentemente o sucesso da Raízen e da GranBio na produção de etanol de segunda geração usando palha e/ou bagaço de cana-de-açúcar (JANSEN et al., 2017; RAÍZEN, 2018) e aprovação do RenovaBIO mudaram o cenário. Com o RenovaBIO, o governo prevê aumentar a produção de etanol e outros biocombustíveis, melhorar o processo de produção e o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis e com menor emissão de gases de efeito estufa (BRASIL, 2017).

Nesse sentido, o aproveitamento energético de outras partes da cana-de-açúcar, como a palha e o bagaço para gerar etanol 2G, como complemento ao 1G (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; MORIYA; GONÇALVES; DUARTE, 2007) poderá aumentar a produção global de etanol e gerar mais crédito de descarbonização. Entretanto, para obtenção de sistemas de produção de etanol 2G sustentáveis e economicamente viável é necessário o aproveitamento integral de todas as frações da biomassa, principalmente celulose, hemicelulose e lignina (SZCZERBOWSKI et al., 2014). Dentre tais frações, o aproveitamento da hemicelulose e da lignina tem sido um dos principais gargalos enfrentados por empresas dedicadas a produzir etanol 2G (JANSEN et al., 2017).

3.1 Importância econômica da hemicelulose

Geralmente, em torno de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha de cana-de-açúcar (base seca) são gerados a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar processada (SANTOS et al., 2012), sendo que celulose e hemicelulose representam cerca de 33-55 % e 10-30 %, respectivamente, nessas biomassas (ROCHA et al., 2015a; SZCZERBOWSKI et al., 2014). Análise econômica relacionando teor de celulose, potencial de conversão a etanol de 90 % e capacidade de produção estima que cerca de 208 milhões de toneladas de palha e de bagaço, geram em torno de 87 bilhões e 100 bilhões de litros de etanol, respectivamente (NUNES et al., 2013). O aproveitamento da hemicelulose dentro dessa perspectiva poderá aumentar em mais de 50 % o rendimento global de etanol (SÁNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Alguns dos fatores responsáveis por aumentar o custo de produção de etanol celulósico em escala industrial são custo de biomassa e manutenção de equipamentos, pré-tratamento, rendimento de etanol e preços das enzimas (JANSEN et al., 2017). Uma maneira de reduzir o custo global de produção de etanol 2G é a simplificação do processo e a maximização do aproveitamento dos componentes da biomassa dentro do contexto biorrefinaria. Gubicza et al. (2016) estimam que o desenvolvimento de biocatalisadores tolerantes aos inibidores, fermentação de pentoses e hexoses no mesmo reator e eliminação da etapa de detoxificação poderá reduzir o custo global de produção de etanol. Kumar e Murthy (2011) executaram uma análise tecno-econômica com “*grass straw*” pré-tratada com ácido diluído e verificaram que o custo de produção final de etanol foi de 1,92 \$/L, com maior gasto na manutenção dos equipamentos de pré-tratamento e detoxificação. Além disso, os pesquisadores observaram que com o incremento e eficiência de fermentação das pentoses em 90 %, o preço global do etanol por litro reduz para 0,76 \$/L (KUMAR; MURTHY, 2011). Em resumo, a redução de etapas, como a detoxificação, aproveitamento eficiente de pentoses por leveduras tolerantes aos inibidores, redução do custo de enzimas e biomassa poderá contribuir com a viabilidade econômica do etanol celulósico.

3.2 Potencial biotecnológico de leveduras não convencionais

As leveduras são fungos unicelulares que não formam corpos de frutificação, geralmente, pertencente ao subfilo Saccharomycotina, as quais possuem ecologia e metabolismo bem diversificado (HITTINGER et al., 2015). As leveduras têm ganhado mais destaque entre os microrganismos etanologênicos, sobretudo pela fermentação de hexoses

de forma eficiente, como a *Saccharomyces cerevisiae*; entretanto, a produção de etanol pelas pentoses carece de mais estudos (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Muitos estudos tem buscado selecionar leveduras de fontes naturais que fermentem xilose, com destaque para *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum* (CADETE et al., 2013; CADETE et al., 2016; LONG et al., 2012; NGUYEN et al., 2006). Dentre as leveduras promissoras, a *Spathaspora passalidarum* tem ganhado relevância pelo uso eficiente de xilose, cofermentar xilose, glicose e celobiose em condições de microaerofilia; possuir xilose redutase (XR) com preferência por NADH que NADPH, o que resolve o problema do desbalanço de cofator e consequente maior produção de etanol (CADETE et al., 2016; LONG et al., 2012; SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). Tais características tornam a *S. passalidarum* um ótimo candidato para conversão das pentoses e hexoses em bioetanol; entretanto, a baixa tolerância aos inibidores presente no hidrolisado hemicelulósico em relação a outros microrganismos tem sido um problema (HOU; YAO, 2012).

3.3 Ecologia e fisiologia de *Spathaspora passalidarum*

A *Spathaspora passalidarum* é uma levedura nativa, pertencente ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e clado CUG-ser (RILEY et al., 2016), isolada inicialmente do intestino de besouros *Odontotaenius disjunctus* (ordem Coleoptera e família Passalidae) no estado de Louisiana (EUA) por NGUYEN et al. (2006). Entretanto, pesquisas apontam que o ambiente nativo mais provável dessa levedura são as galerias e túneis escavados pelo besouro que o próprio intestino (NGUYEN et al., 2006). No Brasil, tal levedura tem sido isolada a partir de amostra de madeira em decomposição na floresta Amazônica (CADETE et al., 2012). Devido a associação e adaptação dessa levedura aos ambientes colonizado pelo besouro, a *Spathaspora passalidarum* obteve destaque na utilização de várias fontes de carbono, como glicose, xilose e celobiose ou ambos, tornando uma levedura interessante para fermentação da fração hemicelulósica (CADETE et al., 2013; NGUYEN et al., 2006).

Quanto a etimologia, o gênero *Spathaspora* é um adjetivo feminino que deriva do latim, sendo que *Spatha* significa forma de espada e *spora* semente, ou seja, esporo em forma de espada, uma terminologia bem adequada para o tipo de estrutura em forma de asco formada durante a reprodução sexuada dessa levedura. A espécie *passalidarum* deriva da família Passalidae, que pertence às espécies de besouros que se alimentam de madeira, onde a levedura foi encontrada inicialmente (NGUYEN et al., 2006).

A *Spathaspora passalidarum* possui reprodução assexuada e sexuada (NGUYEN et al., 2006). A reprodução assexuada relata nessa levedura é o brotamento, sendo que nesse

tipo de reprodução, uma célula haplóide sofre mitose com posterior evaginação da membrana plasmática e formação de broto multilateral (Figura 1.6 A). Células vegetativas globosas originam pseudo-hifas (Figura 1.6 C) e hifas septadas (Figura 1.6 D). Na reprodução sexuada, células haplóides trocam material genético gerando uma célula diplóide, onde sofre alongamento e diferenciação em asco (Figura 1.6 E) que por meiose origina quatro ascósporos haplóide (Figura 1.6 F, G, H e I) (NGUYEN et al., 2006).

Figura 1.6 - Reprodução sexuada e assexuada de *Spathaspora passalidarum*

Fonte: Adaptado de Nguyen et al. (2006).

Nota: A - brotamento; B- células vegetativas e alongadas; C- formação de pseudo-hifas; D- células vegetativas com hifas septadas; E - diferenciação de células em asco; F- asco sem ascósporos; G – asco e ascósporo; H- ascosporo liberado pelo asco por pressão física e I- ascósporo dentro do asco.

Quanto aos requerimentos nutricionais, a tiamina e a biotina são vitaminas importantes para o crescimento celular e o nitrato não é assimilado, como fonte de nitrogênio pela levedura (NGUYEN et al., 2006). Quanto a fisiologia, foi registrado a produção de xilitol, ribitol, glicerol, arabitól, ácido acético, butanediol, etanol e entre outros subprodutos pelo metabolismo (SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). Filogeneticamente e bioquimicamente, a *Spathaspora passalidarum* possui relações próximas com a *Scheffersomyces stipitis*

(HITTINGER et al., 2015; RILEY et al., 2016). Entretanto, tal levedura tem menor quantidades de genes relacionados com as enzimas para assimilar xilose (RILEY et al., 2016).

3.4 Metabolismo de leveduras que fermentam pentoses

O metabolismo das pentoses tem início a partir da absorção dos carboidratos do meio de cultivo e transporte através da membrana. O transporte de xilose pode ser executado por difusão facilitada ou transporte ativo, onde os transportadores possuem sistemas de alta ou baixa afinidade (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009)(Figura 1.7).

Geralmente, os sistemas de alta afinidade são por meio do simporte/ H^+ , com gasto de ATP e contra um gradiente de concentração (Figura 1.7 B). Por outro lado, os sistemas de baixa afinidade são por difusão facilitada e a favor do gradiente de concentração (Figura 1.7 A) (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009). Em *Scheffersomyces stipitis*, o simporte/ H^+ possui sistema de baixa e alta afinidade, sendo que glicose entra na célula por sistema de baixa afinidade e restringe a alta afinidade do transporte de xilose (KILIAN; VAN UDEN, 1988). Em *Scheffersomyces shehateae*, um sistema de baixa afinidade transporta glicose e xilose por difusão facilitada, porém glicose e xilose são transportados com diferentes afinidades quando o transporte passa a ser ativo (simporte/ H^+) (LUCAS; VAN UDEN, 1986). De forma geral, glicose reduz a alta afinidade dos transportadores de xilose e compete com xilose por facilitadores de baixa afinidade (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009). Existem poucos estudos sobre os tipos de transportadores e mecanismos de regulação em leveduras que fermentam pentoses. Inclusive, não existem até o presente momento estudos detalhados com *S. passalidarum*.

Figura 1.7 - Principais mecanismos de absorção da xilose em leveduras descrita na literatura

Fonte: Desenvolvido pelo BioRender (BIORENDER, 2019).

Nota: **A** - difusão facilitada mediada por permeases e a favor de um gradiente de concentração; **B** – transporte ativo/ simporte, onde a xilose é transportada pela força próton motiva com gasto de ATP e contra um gradiente de concentração.

Dentro da célula, pentoses são processadas pelo metabolismo microbiano. A via de assimilação da D-xilose e da L-arabinose, os quais são os açúcares mais abundantes na hemicelulose, possuem rotas por oxidoredutases e isomerases (Figura 1.8), que envolve a participação, principalmente, da via das pentoses com direção obrigatória para formação de D-xilulose-5-fosfato, como ponto comum para assimilação (YOUNG; LEE; ALPER, 2010). Em leveduras, a D-xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR, EC: 1.1.1. 307), geralmente, com dupla especificidade pelos cofatores NADPH ou NADH, porém com preferência por NADPH; xilitol é oxidado a D-xilulose por xilitol desidrogenase (XDH, EC: 1.1.1. B19), tendo como cofator NAD^+ ; D-xilulose recebe um grupo fosfato no carbono cinco pela xilulose quinase (XK, EC: 2.7.1.17) para formar xilulose-5-fosfato que é utilizado para conversão em intermediários da glicólise pela via não oxidativa das pentoses (KUHAD et al., 2011). A disponibilidade de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ regula a redução de D-xilose, bem como controla o ciclo das pentoses.

A assimilação da L-arabinose possui rotas parecidas com a xilose, a L-arabinose é reduzida a L-arabitol por arabinose redutase (ArdA, EC: 1.1.1.21), também, com dupla especificidade por NADPH ou NADH; L-arabinitol é oxidado para L-xilulose por arabitol-4-desidrogenase (LAD, EC: 1.1.1.12) dependente de NAD^+ ; L-xilulose é reduzido a xilitol por L-xilulose redutase (LXR, EC: 1.1.1.10), onde o xilitol é processado de maneira similar na via de assimilação da xilose (YOUNG; LEE; ALPER, 2010). O grande problema nas

rotas das oxidorreduções é o desbalanço de cofatores que reduz o consumo das pentoses e produção de etanol (KUHAD et al., 2011; SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015; YOUNG; LEE; ALPER, 2010). Estratégias, como expressão heteróloga em *S. cerevisiae* da xilose redutase (XR) com preferência por NADH tem sido executada de forma eficiente, resultando em ganhos na produção de etanol (CADETE et al., 2016).

Quanto as isomerases (Figura 1.8), esta via não necessita de cofatores, resolvendo o problema do desbalanço; entretanto, tem sido documentado em bactérias e pouco em fungos. Na rota com a xilose, a xilose isomerase (XI, EC: 5.3.1.5) converte D-xilose a D-xilulose diretamente e depois xilulose quinase converte para D-xilulose-5-fosfato. Entretanto, para assimilação da L-arabinose, três enzimas são importantes, como L-arabinose isomerase (araA, EC: 5.3.1.4), L-ribulose quinase (araB, EC: 2.7.1.16) e L-Ribulose-5-fosfato-4-epimerase (araD, EC: 5.1.3.4), convertendo em D-xilulose-5-fosfato. Genes da xilose isomerase de fungos e de bactérias tem sido expresso em *S. cerevisiae* com sucesso, mesmo com consumo da xilose, a produtividade de etanol tem sido baixa (MOYSÉS et al., 2016; SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). O passo posterior para entrada de intermediários da via não oxidativa das pentoses na via glicolítica é a conversão de D-xilulose-5-fosfato para gliceraldeído-3-fosfato por transcetolases (TK, EC: 2.2.1.1) ou frutose-6-fosfato por transaldolases (TA, EC: 2.2.1.2). O gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato é finalmente convertido em várias etapas no piruvato pela glicólise, o qual pode ser direcionado para vários produtos, dependendo das condições e fisiologia do microrganismo (etanol, acetil-CoA, acetato e outros)(KUHAD et al., 2011).

Figura 1.8 - Assimilação de pentoses pelo metabolismo microbiano por oxidorreduções e isomerases

Fonte: Adaptado de Young, Lee e Alper (2010).

Em condições de anaerobiose ou microaerofilia em leveduras, o piruvato formado na glicólise é convertido a etanol (KUHAD et al., 2011). Quanto a produção de etanol, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase (PDC, EC: 4.1.1.1) em acetaldeído, o qual é posteriormente reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (ADH, EC: 1.1.1.1) dependente de NADH. Em condições de anaerobiose, tal etapa é importante para liberar cofatores, especialmente, NAD^+ oxidado para garantir o fluxo na glicólise (KUHAD et al., 2011). Em leveduras que fermentam pentoses e hexoses, tal situação é ainda mais crítica, sendo necessário a produção de muitos polióis, como glicerol, xilitol, arabitól, ribitol e entre outros para proporcionar o máximo controle do balanço redox e fluxo no ciclo das pentoses e glicólise (SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). Estudos relatam que a produção de alguns polióis, como glicerol reduzem a produção de etanol pela competição por NADH (LIU et al., 2013). A atividade parcial do ciclo do ácido cítrico é mantida durante fermentação, sendo que vários ácidos orgânicos, como malato, citrato e succinato podem ser produzidos (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

Os microrganismos aeróbios facultativos, como a *Saccharomyces cerevisiae* podem sobreviver na presença ou ausência de oxigênio. Entretanto, o oxigênio é a fonte aceptora preferencial de elétrons, devido a maior produção de ATP (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006). As leveduras que fermentam pentoses, geralmente, possuem bom

desempenho em condições de microaerofilia. O oxigênio em baixa concentração tem papel fundamental na fermentação das pentoses em etanol, como manutenção do balanço redox, na assimilação da xilose e da arabinose, transporte de xilose, crescimento, produção de ergosterol e ácidos graxos (KUHAD et al., 2011; LIU et al., 2013).

3.5 Produção de etanol pela fermentação de hidrolisado hemicelulósico

A produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico é essencial para tornar o etanol lignocelulósico economicamente viável. Além disso, a cofermentação de hexoses por tais microrganismos é interessante para aplicação dentro do processo consolidado (MOHD AZHAR et al., 2017). Os principais requerimentos de microrganismo promissor para produção de etanol a partir das pentoses são alto rendimento de etanol, elevada produtividade, tolerância aos inibidores e alta concentração de etanol, assim como, habilidade para fermentar em baixo pH (KUHAD et al., 2011). O rendimento teórico de etanol a partir da xilose sem levar em conta a presença de oxigênio na fermentação é 0,51 g de etanol por g de xilose ou 5 mol de etanol por 3 mol de xilose consumida, segundo a reação equilibrada:

Entretanto, vários fatores influenciam para redução do rendimento teórico (Tabela 1.1). A Tabela 1.1 resume os principais microrganismos utilizados para fermentação da fração hemicelulósica e as condições empregadas. Tais microrganismos possuem diferentes características naturais que os tornam vantajosos e desvantajosos na produção de etanol 2G. Como pode ser observado na Tabela 1.1, o ácido sulfúrico diluído é o pré-tratamento mais utilizado para obtenção de hidrolisado rico em pentoses, sobretudo para bagaço de cana-de-açúcar. Após obtenção do hidrolisado este pode ser detoxificado ou não para fermentação. De forma geral, o licor detoxificado possibilita a maior produção de etanol que o não detoxificado, devido a redução dos níveis de inibidores. O inóculo inicial utilizado, geralmente, não ultrapassa os 3g/L, sendo a estratégia de fermentação mais utilizada a fermentação em batelada em biorreator ou erlenmayer.

Tabela 1.1 - Produção de etanol a partir das fermentações das pentoses usando biomassa lignocelulósica na literatura

Biomassa	Pré-tratamento	Detoxificado	Célula inicial (g/L)	Organismo	Açúcar (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (g/g)	Referência
<i>Acer saccharum</i> (cavacos de madeira)	Hidrotérmico	Filtração por membrana	0,8	<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	65 xil 35 gli	39	0,37	Long et al. (2012)
<i>Acer saccharum</i> (cavacos de madeira)	Hidrotérmico	Filtração por membrana	-	<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	29,17 xil 9,91 gli	11	0,38	Stoutenburg et al. (2008)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Eletrodialise	0, 25	<i>Pochysolen tannophilus</i> DW06	45 xil 9,3 Gli	19	0,34	Cheng et al. (2008)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Não	0, 25	<i>Pochysolen tannophilus</i> DW06	42,8 xil 9,1 gli	1,9	0,33	Cheng et al. (2008)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	0, 5	<i>Spathaspora passalidarum</i> UFMG-HMD-1.1	50,2 xil 5,3 gli	8,8	0,20	Cadete et al. (2012)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Não	2,0	<i>Scheffersomyces shehateae</i> TTC79	17 xil 12 gli	12,5	0,46	Senatham et al. (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (HCl)	Carvão ativado	2,5	<i>Candida shehatae</i> NCIM 3501	16,5 xil 1,8 gli	7,43	0,42	Chandel et al. (2007)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Alteração do pH	3,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	23,5 xil 3 gli	4,9	0,20	Canilha et al. (2010)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	3,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> DSM 3651	20,8 xil 2,7 gli	6,1	0,30	Canilha et al. (2010)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Resina de troca iônica	3,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> DSM 3651	23,6 xil 1,9 gli	7,5	0,30	Canilha et al. (2010)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	2,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> UFMG-IMH 43.2	75 xil 9 gli	5,9	0,11	Ferreira et al. (2011)

(Continua)

(Conclusão)

Biomassa	Pré-tratamento	Detoxificado	Célula inicial (g/L)	Organismo	Açúcar (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (g/g)	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	0,5	<i>Scheffersomyces shehatae</i> BR6-2AY	52 xil 3,63 gli	11,49	0,30	Martiniano et al. (2013)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	1,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y- 7124	50 xil	7,34	0,16	Dussán et al. (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	1, 0	<i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG HM 52.2	50 xil	18	0,44	Dussán et al. (2016)
<i>Eucalyptus globulus</i> (cavacos de madeira)	Explosão a vapor	Não	1,0	<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	12 xil 80 gli	10	0,22	Morales et al. (2017)
<i>Miscanthus giganteus</i> (partes da planta)	Ácido oxálico	“Overliming”	2,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	30 xil 5 gli	12	0,38	Scordia, Cosentino e Jeffries (2013)
<i>Olea europaea</i> L. (material moído)	Explosão a vapor com (H ₃ PO ₄)	Resina de troca iônica	1,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	13 xil 6 gli	7,7	0,37	Negro et al. (2014)
Palha de arroz	Ácido (H ₂ SO ₄)	“Overliming”	1,5	<i>Scheffersomyces stipitis</i> BCRC21 777	21,2 xil 3,3 gli	9,29	0,37	Huang et al. (2009)
Palha de arroz	Ácido (H ₂ SO ₄)	Não	1,5	<i>Scheffersomyces stipitis</i> BCRC21 777	21,2 xil 3,3 gl	9,38	0,40	Huang et al. (2009)
Palha de milho	Ácido (H ₂ SO ₄)	Não	2,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	33,54 xil 8,19 gli	15,06	0,37	Agbogbo e wenger (2007)
Palha de milho	Explosão a vapor	“Steam stripping+Overliming”	-	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 5776	45 xil	15,92	0,40	Zhu et al. (2009)
Polpa de beterraba moída	Ácido (H ₂ SO ₄)	Carvão ativado	2,0	<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	48 total	11,7	0,24	Yücel e Aksu (2015)

Fonte: Arquivo pessoal.

4. PRÉ-TRATAMENTO

A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração envolve muitos desafios, devido particularmente às propriedades recalcitrantes da biomassa (ZHAO;

ZHANG; LIU, 2012b). A dificuldade na obtenção do etanol celulósico está em disponibilizar as fibras de celulose ao ataque das enzimas celulases, pois a camada constituída por hemicelulose e, principalmente, barreira de lignina dificulta o acesso para hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A hidrólise enzimática da biomassa pode ocorrer em condições amenas de pH e temperatura, porém para eficiente hidrólise, é necessário pré-tratamento disponibilizando celulose ao ataque enzimático (ROCHA et al., 2012a).

Desta forma, vários pré-tratamentos têm sido utilizados na desconstrução do material lignocelulósico, como pré-tratamento biológico (SAAD et al., 2008), físico (SILVA et al., 2010), químico (ROCHA et al., 2012b) e físico-químico (ROCHA et al., 2015b). Entretanto, não existe um pré-tratamento geral que atenda todas as necessidades (ROCHA et al., 2013). Além disso, parte de gastos na produção de etanol de segunda geração está concentrada na etapa de pré-tratamento (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015), tornando necessário mais estudos para viabilizar essa fase. O pré-tratamento químico com ácido sulfúrico diluído tem sido promissor, devido ao alto rendimento de açúcar e baixo custo do componente químico (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). No pré-tratamento em meio ácido, principalmente, a hemicelulose é solubilizada, facilitando o acesso das celulases a celulose. A reação com ácido sulfúrico pode ser executada em condições brandas e severas; entretanto, a performada em condições mais severas consome muita energia, corroe os equipamentos e gera inibidores que interferem nos bioprocessos (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015; ROCHA et al., 2015b). Apesar das condições brandas minimizarem as desvantagens das condições mais severas, ainda são liberados e gerados inibidores de fermentação durante todo processo.

4.1 Reações de carboidratos e lignina em meio ácido

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído do bagaço e da palha de cana-de-açúcar seguido de hidrólise enzimática tem sido bastante utilizado na literatura (CANILHA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2016; REZENDE et al., 2011; ROCHA et al., 2015b). A hidrólise em meio ácido é essencialmente a mais típica degradação da ligação glicosídica de polissacarídeos, sendo importante para obtenção de oligômeros e monômeros (FENGEL; WEGENER, 1989). Vários fatores, como tipo de biomassa, concentração de ácido, temperatura e tempo influenciam nas reações (FENGEL; WEGENER, 1989). As condições de pré-tratamento do bagaço e da palha de cana com ácido sulfúrico diluído tem sido descritas na concentração de 0,5-2 %, temperatura de 100-150 °C e entre 10-30 minutos

(CANILHA et al., 2010; CHENG et al., 2008; MARTINIANO et al., 2013; REZENDE et al., 2011; ROCHA et al., 2015b; SENATHAM et al., 2016).

Na reação em meio ácido, a hemicelulose é o polissacarídeo mais solubilizado, sendo degradada principalmente em xilose, arabinose e ácido acético (CANILHA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). A celulose, nessas condições, torna-se mais acessível para posterior hidrólise enzimática. Os principais grupos funcionais que reagem nos polissacarídeos são hidroxilas, oxigênio da ligação glicosídica e do anel cíclico (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1.9 - Hidrólise de polissacarídeos em meio ácido

Fonte: Adaptado de Henriksson e Lennholm (2009).

Os polissacarídeos são depolimerizado em baixo pH e alta temperatura (CANILHA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). Na reação, o próton liberado que é o catalisador interage rapidamente com oxigênio da ligação glicosídica, seguida de lenta clivagem da ligação $C-O$, resultando em um carbocátion instável em $C-1$, onde com adição de água resulta em um monômero e um próton livre (FENGEL; WEGENER, 1989)(Figura 1.9). Após obtenção dos monômeros, pentoses e hexoses ainda podem sofrer reações secundárias, como a desidratação gerando furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, os quais são inibidores em bioprocessos (FENGEL; WEGENER, 1989) (Figura 1.10).

Figura 1.10 - Furfural e HMF formados durante pré-tratamento em meio ácido

Fonte: Adaptado de Henriksson e Lennholm (2009).

A lignina, também, reage em meio ácido. A reação predominante é a condensação, resultando em acúmulo de material insolúvel e escuro rico em ligações estáveis C-C, os quais são chamados de lignina insolúvel e determinado por método gravimétrico (FENGEL; WEGENER, 1989; ROCHA et al., 2015b). As reações podem ocorrer em grupos hidroxil e grupos éter da lignina, resultando em um intermediário instável ion carbânion com afinidade por reação nucleofílica (FENGEL; WEGENER, 1989) (Figura 1.11). Devido à baixa remoção de lignina em meio ácido, geralmente é necessário uma etapa de deslignificação para posterior hidrólise enzimática (ROCHA et al., 2015b).

Figura 1.11 - Reação de condensação da lignina em meio ácido

Fonte: Adaptado de Henriksson e Lennholm (2009).

Outros componentes, como os extrativos reagem com o próton liberado. Além disso, ocorrem outros tipos de reações menos comum, como oxidação de carboidratos e de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

4.2 Produtos de degradação oriundos de pré-tratamento em meio ácido e alcalino

O pré-tratamento e as condições aplicadas geram produtos de degradação em quantidades e tipos diferentes (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Em hidrólise ácida, os principais produtos formados são os derivados furânicos, ácidos fracos e derivados de lignina. As pentoses e hexoses são desidratadas a furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. Sob condições mais severas, o HMF pode ser convertido a ácido fórmico e levulínico (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). A clivagem das ligações éter e outras ligações suscetíveis em meio ácido na lignina resulta na condensação e formação de vários compostos fenólicos, como ácido *p*-cumárico, ferúlico, vanilina e entre outros (XU et al., 2005a). Os grupos acetilas, também, são hidrolisados nas cadeias de xilanas em meio ácido, o que resulta na formação de ácido acético (FENGEL; WEGENER, 1989). Embora o pré-tratamento em meio ácido seja considerado um pré-tratamento eficaz e aplicável em larga escala, tal método gera uma quantidade enorme de produtos de degradação em comparação a outros tipos de pré-tratamento, o que torna importante a adoção de estratégias para minimizar a formação.

Em condições alcalinas, tem-se pouca formação de produtos de degradação. Os principais componentes gerados são ácidos fenólicos ricos em ligações ésteres, ácido acético e remoção extensiva ou parcial de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). Apesar das condições alcalinas não afetarem muito os carboidratos, acima de 100 °C pode ocorrer a reação de “peeling”, a qual é responsável pela hidrólise dos carboidratos, principalmente, hemicelulose gerando ácidos carboxílicos (lático, fórmico e sacarínico) (FENGEL; WEGENER, 1989). A clivagem das ligações éter β -O-4 na lignina e ésteres entre lignina e hemicelulose, resulta na fragmentação da lignina e formação de vários compostos fenólicos, como ácidos *p*-cumárico, ferúlicos, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído e sirínico (XU et al., 2005a). Além disso, os grupos acetilas presente na hemicelulose são seletivamente removidos pelo processo de saponificação das ligações ésteres (FENGEL; WEGENER, 1989). Outros componentes com possíveis atividades inibitórias presentes na biomassa e que pouca atenção tem sido dada são os extrativos e componentes inorgânicos. Os extrativos são compostos heterogêneos, principalmente, terpenos, ácidos graxos, ceras e compostos fenólicos. Pesquisa recente tem mostrado uma composição bem diversificada de componentes lipofílicos em bagaço e palha de cana-de-açúcar, como terpenos, triterpenos,

ácidos graxos, colesterol e tocoferol (DEL RÍO et al., 2015b). Componentes inorgânicos são determinados como cinzas totais após queima da biomassa em mufla. O teor das cinzas totais depende do tipo de biomassa com algumas espécies chegando a 15 %. O bagaço e a palha de cana-de-açúcar possuem cerca de 1-3 % e 3-4 %, respectivamente, de cinzas totais (DEL RÍO et al., 2015a; ROCHA et al., 2015a; SZCZERBOWSKI et al., 2014). A figura a seguir resume as principais rotas envolvidas na formação e liberação de inibidores (Figura 1.12).

Figura 1.12 - Esquema de várias rotas para formação e liberação de inibidores de fermentação em biomassas

Fonte: Adaptado de Jönsson, Alriksson e Nilvebrant (2013).

5. ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE INIBIDORES E ESTUDOS

5.1 Desacetilação alcalina

Existem várias estratégias que podem reduzir os efeitos inibitórios na fermentação, dentre as quais pode ser citada a prevenção da formação de inibidores durante o pré-tratamento (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). A desacetilação alcalina tem surgido como estratégia para redução de inibidores durante pré-tratamento ácido ou com refino mecânico (Tabela 1.2). Tal etapa, executada na literatura inicialmente com palha de milho, tem resultado em múltiplos benefícios. A biomassa desacetilada, geralmente, é submetida a mais uma etapa de pré-tratamento brando (ácido diluído ou refino mecânico), onde tem sido registrado aumento na quantidade de xilose monomérica após pré-tratamento e ganho de glicose na hidrólise enzimática, com reduzidas quantidades de inibidores, como o ácido acético no hidrolisado (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012a; SHEKIRO III et al., 2016). Tais etapas acopladas (desacetilação + pré-tratamento) têm beneficiado a produção

de etanol celulósico e ácido succínico a partir de várias biomassas (CHEN et al., 2012b, 2014; SALVACHÚA et al., 2016 a,b; SHEKIRO et al., 2016), sobretudo pela eficiente remoção de ácido acético, o qual é um inibidor em bioprocessos. Entretanto, faltam estudos com palha e bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, a desacetilação pode ser usada como método eficiente de separação de componentes para aplicações no contexto biorrefinaria, pois o NaOH remove lignina, ácidos fenólicos e grupos acetilas, preservando a hemicelulose para posterior aproveitamento com outro pré-tratamento, como o ácido diluído (KIM; LEE; KIM, 2016; ZHU et al., 2013). Outra vantagem da desacetilação está relacionada a reação acontecer em pressão atmosférica, com reduzido custo referente à pressurização de reatores e aproveitamento da lignina no contexto biorrefinaria, pois tais moléculas não sofrem tantas modificações química durante o processo (LIMA et al., 2018).

Tabela 1.2 - Desacetilação alcalina (NaOH) executada na literatura

Biomassa	Condições de desacetilação	Pré-tratamento	Remoção de ácido acético	Eficiência de fermentação a etanol/ácido succínico	Autores
Palha de arroz	0,8 % NaOH/ 70 °C/ 60 min	1 % H ₂ SO ₄ /121 °C/85 min	98,8 %	73 % de eficiência de fermentação no hidrolisado desacetilado com <i>Scheffersomyces stipitis</i> 49 % de eficiência de fermentação no controle	Castro et al. (2016)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 60 e 80 °C/3 h	0,5 % H ₂ SO ₄ /150 °C/20 min	73-80 %	_____	Chen et al. (2012a)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 70 °C/3 h	0,5 % H ₂ SO ₄ /150 °C/20 min	70 %	80 % de eficiência de fermentação de etanol com <i>Zymomonas mobilis</i> 73 % de eficiência de fermentação no controle	Chen et al. (2012b)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 70 e 80 °C/3 h	Mecânico (Refino)	73-80 %	82 % de eficiência de fermentação com <i>Zymomonas mobilis</i> 63,9 % de eficiência de fermentação só com refino, como controle	Chen et al. (2012c)
(Continua)					

(Conclusão)

Biomassa	Condições de desacetilação	Pré-tratamento	Remoção de ácido acético	Eficiência de fermentação a etanol/ácido succínico	Autores
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	Mecânico (Refino)	80 %	90 % de eficiência de fermentação de etanol com <i>Z. mobilis</i> Sem tratamento controle	Chen et al. (2014)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	Mecânico (Refino)	80 %	90 % de eficiência de fermentação de etanol com <i>Z. mobilis</i> Sem tratamento controle	Chen et al. (2016a)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	0,5 % H ₂ SO ₄ /160 °C/10 min	70 %	66 % de eficiência de fermentação de ácido succínico com <i>Actinobacillus succinogenes</i> 47 % eficiência de fermentação de ácido succínico no controle	Salvachúa et al. (2016)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	0,5 % H ₂ SO ₄ /160 °C/10 min	70 %	62 % de eficiência de fermentação de ácido succínico com <i>Basfia succiniciproducens</i> Sem tratamento controle	Salvachúa et al. (2016a)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	0,5 % H ₂ SO ₄ /150 °C/20 min	80 %	85 % de eficiência de fermentação de etanol com <i>Zymomonas mobilis</i> Sem tratamento controle	Shekiri III et al. (2016)
Palha de milho	0,4 % NaOH/ 80 °C/2 h	0,26 % H ₂ SO ₄ /160 °C/10 min	80 %	_____	Shekiri III et al. (2014)
<i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Cavacos de madeira)	0,8 % NaOH/ 60 °C/80 min	50 mM C ₂ H ₂ O ₄ /150 °C/30 min	80 %	91 % de eficiência de fermentação de etanol com <i>Scheffersomyces stipitis</i> Sem tratamento controle	Kundu, Lee e Lee (2015)

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2 Metabolômica aplicada à bioenergia

Produção eficiente de biocombustíveis requer entendimento dos complexos mecanismos regulatórios e da função metabólica (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017). Nos últimos anos, avanços em cromatografia, espectrômetro de massas e bioinformática tem possibilitado acurada identificação e quantificação de metabólitos intracelulares e análises de fluxo metabólico em leveduras (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014), guiando a otimização de vias deficientes por engenharia metabólica, otimização do balanço redox, compreensão da resposta celular aos estresse por inibidores, caracterização do metabolismo de leveduras nativas e engenheiradas (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017). A seguir são apresentadas as principais etapas para o preparo de amostras para metabolômica e as técnicas mais utilizadas para identificar e quantificar os metabólitos.

5.3 Preparo da amostra e análise por GC-MS e LC-MS em leveduras

A análise por metabolômica depende de uma série de fatores, como tipo de amostra, abordagem da metabolômica, preparo da amostra, método de extração, método analítico, processamento dos dados, análise estatística e interpretação dos dados (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014). A metabolômica pode ser aplicada em vários tipos de amostras biológicas, como fungos, leveduras, bactérias, plantas e fluídos (CANUTO et al., 2017). Após a escolha do material biológico, a próxima etapa é o tipo de abordagem da metabolômica a ser definida de acordo com o objetivo do estudo, sendo que a escolha influência diretamente nos processos seguintes e no resultado final (REN et al., 2015). As principais abordagens utilizadas são a metabolômica alvo (targeted metabolomic) e metabolômica geral (untargeted metabolomic) (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017; REN et al., 2015). A primeira escolha é utilizada quando o pesquisador deseja avaliar um composto ou classes de compostos, sendo uma abordagem quantitativa e necessitando do uso de padrões. Por outro lado, a metabolômica geral é uma abordagem mais qualitativa e os compostos são identificados em bibliotecas de espectros (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017; REN et al., 2015).

Após a escolha do material biológico e abordagem de estudo, o preparo adequado da amostra é essencial. Para leveduras, após coleta da amostra é necessário a inativação do metabolismo celular por meio do *quenching*, variando a temperatura ou pH (CARNEIRO; PEREIRA; ROCHA, 2014; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Os principais reagentes utilizados são solventes orgânicos, como o metanol e o etanol e ácidos e bases, como ácido perclórico

e hidróxido de sódio, sendo o metanol gelado a -40 °C o mais utilizado para essa etapa por danificar menos a célula (DING et al., 2011b; VILLAS-BÔAS et al., 2005; WANG et al., 2013). O principal problema envolvendo o uso do metanol gelado é a perda de metabólito intracelular por meio do arraste, o que pode ser reduzido pela redução do tempo de contato entre o metanol e as células (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Posteriormente, as células são separadas do meio de cultivo e da solução de *quenching* por centrifugação ou filtração (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

A próxima etapa é a extração dos metabólitos intracelular no *pellet*, onde a escolha da solução extratora depende das classes de metabólitos a serem avaliados (CARNEIRO; PEREIRA; ROCHA, 2014; VILLAS-BÔAS et al., 2005). As principais soluções extratoras utilizadas são acetonitrila-etanol, etanol quente, metanol-clorofórmio, ácido perclórico e o próprio metanol gelado (CARNEIRO; PEREIRA; ROCHA, 2014). Após a seleção do método de preparo da amostra e extração, a etapa seguinte é a escolha da técnica para identificação e quantificação dos metabólitos extraídos, sendo a mais utilizada a cromatografia líquida ou gasosa associada ao espectômetro de massas (GC-MS e LC-MS) (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014). A escolha da técnica depende das propriedades dos compostos a serem avaliados, normalmente o GC-MS é mais utilizado para compostos voláteis, porém através da técnica de derivatização, compostos não voláteis, também, podem ser detectados (WANG et al., 2013). O GC-MS com derivatização dos compostos tem sido a ferramenta mais utilizada na literatura para metabolômica em leveduras (DING et al., 2011a, 2012a; WANG et al., 2013), devido sua alta robustez e repetibilidade, assim como pela maior disponibilidade de bibliotecas de espectros (CANUTO et al., 2017). Atualmente, o uso de LC-MS para análise de metabólito vem crescendo, sendo método robusto, sensível e seletivo (CANELAS et al., 2009; CRUTCHFIELD et al., 2010; JORDÀ et al., 2013; XU et al., 2015). Tal técnica tem como vantagem abranger larga amplitude de compostos, facilidade de operação e sem necessidade da etapa de derivatização (CANUTO et al., 2017; CRUTCHFIELD et al., 2010).

Na última etapa do experimento com metabolômica, aplicam-se o processamento dos dados brutos, análise estatística e interpretação. Para metabolômica geral, o processamento dos dados brutos envolve alinhamento, agrupamento, correção do tempo de retenção e de linha de base, deconvolução dos espectros e normalização (CANUTO et al., 2017). Existem vários softwares comerciais e abertos, tais como Target Search e TagFinder para GC-MS ou combinação de ambos, como MetAlign ou XCMS para GC-MS ou LC-MS (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014; SPICER et al., 2017), usados no tratamento dos dados para

metabolômica geral. Em relação a metabolômica com alvo, os resultados são expressos por quantificação dos metabólitos pré-selecionados, usando padrões internos sem necessidade de várias etapas para processamento dos dados (CANUTO et al., 2017).

Para comparação entre controle e tratamento, o uso da estatística multivariada e univariada é importante (CANUTO et al., 2017). Na estatística multivariada, aplicação de métodos não supervisionado, como análises dos componentes principais (PCA, do inglês, principal component analysis) e método supervisionado, como análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA, do inglês, partial least squares discriminant analysis) tem sido usado para distinguir diferenças entre grupos e suas relações. Na análise univariada, como ANOVA e teste t de Student, os metabólitos são comparados separadamente sem levar em conta as suas relações (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014; CANUTO et al., 2017).

Em metabolômica, dados complexos são obtidos após estatística e precisam de identificação e interpretação. A etapa de identificação de metabólitos é apenas aplicada a metabolômica global, usando bibliotecas espectrais disponíveis (CANUTO et al., 2017). Quanto a interpretação biológica, a incorporação dos dados em bibliotecas, como KEGG (do inglês, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e BioCyc permitem correlação dos metabólitos identificados e alterados com uma via específica, facilitando a interpretação (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014). Atualmente, várias ferramentas online como Galaxy-M, Workflow4metabolomics e MetaboAnalyst fornecem uma plataforma intuitiva, gratuita e integral quanto ao tratamento, estatística e interpretação dos dados para metabolômica global e com alvo (SPICER et al., 2017).

5.4 Endometabolômica e estudos de inibidores

A metabolômica tem sido usada para análise da resposta celular ao estresse com inibidores por meio das alterações dos perfis metabólicos intracelulares, fornecendo informações úteis sobre a relação complexa entre levedura e inibidores (DING et al., 2012a, 2011b; HASUNUMA et al., 2011). Tais efeitos devem ser mais evidente em hidrolisado resultante da fração hemicelulósica, devido a diversidade de inibidores formados e liberados (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Estudos recentes com endometabolômica tem ajudado a elucidar os mecanismos de toxicidade de várias classes de inibidores, como ácidos fracos, derivados furânicos e fenólicos, os quais tem possibilitado a adoção de métodos para melhorar a tolerância de leveduras ao estresse por inibidores (DING et al., 2012a, 2011b; DING; ZHOU; YUAN, 2010)(Tabela 1.3).

Tabela 1.3 - Alterações no metabolismo de leveduras na presença de inibidores avaliadas por endometabolômica

Meio	Inibidor	Análise	Levedura	Metabólitos alterados	Autores
Definido	HMF e furfural	HPLC	<i>S. cerevisiae</i> engenheirada	+ Xilitol; - NADPH; ATP.	Ask et al. (2013)
Definido	Ácidos fracos	HPLC	<i>S. cerevisiae</i>	+ Trealose e glutatona; - ATP.	Guo e Olsson (2014)
Definido	Furfural	HPLC	<i>S. cerevisiae</i>	+ Álcool furfúrfico e ácido furóico.	Horváth et al. (2003)
Definido	Ácido acético	³¹ P-RMN	<i>S. cerevisiae</i>	- Intermediários da glicólise e produção de ATP.	Pampulha e Loureiro-Dias (1990)
Semidefinido	Ácido acético; Fenol; Furfural.	GC-MS	<i>S. cerevisiae</i>	+ Aminoácidos; cadaverina; inositol; - Intermediários do ciclo de krebs.	Ding et al. (2011a)
Semidefinido	Ácido acético; Fenol; Furfural.	GC-MS	<i>S. cerevisiae</i>	+ Aminoácidos e inositol; - Intermediários da glicólise; ciclo de krebs; glicerol.	Ding et al. (2012)
Semidefinido	Ácido acético; Fenol; Furfural.	GC-MS	<i>S. cerevisiae</i>	+ 2,3 butanediol, 2-ácido furóico, etanolamina e alanina; + Glicose, piruvato, glicerol, glicerol-3-P; - GABA; aminoácidos glicogênicos.	Wang et al. (2013)
Semidefinido	Ácido acético; Fenol; Furfural.	GC-MS	<i>S. cerevisiae</i> engenheirada	+ Trealose, cadaverina, GABA, manitol; - Glicerol; xilitol; prolina, glutamato; lisina, glicina e ácido pirúvico.	Wang et al. (2014)
Semidefinido	Ácidos fracos	GC-MS	<i>S. cerevisiae</i> engenheirada	- Intermediários da via das pentoses.	Hasunuma et al. (2011)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: +Aumento na produção de metabólitos; - Redução na produção de metabólitos.

Dentre os ácidos fracos, o ácido acético tem se destacado como principal inibidor em bioprocessos (VAN DER POL et al., 2014). Estudos indicam que o ácido acético pode ser responsável pela acidificação do citosol e acúmulo como metabólito aniônico, reduzindo o fluxo em algumas vias (AXE; BAILEY, 1995; HASUNUMA et al., 2011; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990). O ácido acético sozinho ou combinado com outros inibidores em meio semidefinido para fermentação reduziu o crescimento celular e produção de etanol celulósico em *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces marxianus* e *Scheffersomyces stipitis* (BELLIDO et al., 2011; KEATING; PANGANIBAN; MANSFIELD, 2006). Estudos com endometabolômica tem revelado que na presença do ácido acético, a produção de trealose e glutatona relacionado ao ajuste osmótico e proteção contra estresse oxidativo, respectivamente, tem sido importante para tolerância (GUO; OLSSON, 2014). A redução do fluxo na via das pentoses e glicólise (HASUNUMA et al., 2011; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990; WANG et al., 2014) e aumento na produção de aminoácidos (DING et al., 2011a) têm sido relacionado a presença do ácido acético (Tabela 1.3). De forma geral, o gasto com ATP, usando bomba de próton para expulsão do próton do citoplasma, é o principal mecanismo de tolerância das levedura aos ácidos fracos (GUO; OLSSON, 2014; LIU, 2011; WANG et al., 2013).

Os derivados furânicos podem ser responsáveis pela inibição de algumas enzimas desidrogenases na glicólise e por estimular a produção de espécies reativas do oxigênio (ALLEN et al., 2010; HORVÁTH et al., 2003; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). Análises com endometabolômica mostraram que os derivados furânicos podem ser convertidos em formas menos tóxicas (álcool furfurílico) (HORVÁTH et al., 2003)(Tabela 1.3). Além disso, a principal via de bioconversão dos derivados furânicos em formas menos tóxicas envolve o uso de poder redutor, como NADH e NADPH (LIU, 2011), o que impossibilita seu destino para produção de outros compostos, como etanol.

Para os produtos de degradação da lignina, tal ação não tem sido bem esclarecida, devido a diversidade de grupos formados. Entretanto, foi registrado que os componentes de baixa massa molar podem ser responsáveis por alterar a fluidez das membranas (FITZGERALD et al., 2004). Estudos revelaram que a maior produção de inositol foi importante para regulação da produção de fosfolipídios e posterior reparo de membranas, como resposta ao estresse por fenólicos (DING et al., 2011a)(Tabela 1.3). Além disso, para os fenólicos de baixa massa molar que possuem grupos aldeídos, o uso de poder redutor (NADH e NADPH) tem sido importante, também, para conversão em formas menos tóxica (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2017).

Na presença de múltiplos inibidores (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenol) em meio semidefinido, tem sido relatado a redução dos níveis de intermediários da glicólise, ciclo de krebs, bases púricas e pirimídicas (DING et al., 2011a, 2012a; WANG et al., 2014). Por outro lado, a maior produção de aminoácidos foi observado, o qual foi relacionado a degradação de proteínas anormais formada durante o estresse (DING et al., 2011a; WANG et al., 2013). Wang et al. (2013) registraram que alanina e GABA (ácido gama-aminobutírico) podem ser possíveis biomarcadores, envolvidos na tolerância ao estresse por múltiplos inibidores. Acúmulo de poliaminas (cadaverina), polióis (inositol) e trealose também foram relatados como importantes para tolerância aos múltiplos inibidores, com papel na proteção contra o estresse oxidativo, reparo de membrana e osmoregulação (DING et al., 2011a, 2012a; WANG et al., 2014)(Tabela 1.3).

A avaliação das leveduras na presença de um único ou múltiplo inibidor em meio definido ou semidefinido é importante (Tabela 1.3), entretanto; não avalia a situação real com fermentação de hidrolisado, pois todos os componentes inibitórios estão presente e possuem atividades sinérgicas e antagônicas. Além disso, tais estudos com endometabolômica tem sido realizado, principalmente, com *S. cerevisiae* (Tabela 1.3) (DING et al., 2011b; DING; ZHOU; YUAN, 2010; WANG et al., 2013); porém, faltam estudos com outras leveduras promissoras, como a *S. passalidarum* em hidrolisado hemicelulósico, o qual é rico em múltiplos inibidores.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

Alcançar progressos científicos no processo de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a estratégia de desacetilação alcalina para melhorar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico e a metabolômica como ferramenta para avaliar a influência dos inibidores sobre a fermentação da fração hemicelulósica.

6.2 Específicos

- Realizar a etapa de desacetilação alcalina do bagaço e da palha de cana em escala laboratorial visando definir as melhores condições de concentração de álcali (NaOH), temperatura e tempo que maximizem a remoção dos grupos acetila com mínimo de degradação da hemicelulose;
- Investigar em escala laboratorial como a desacetilação alcalina altera a composição química e a estrutura em multiescala em palha e bagaço de cana-de-açúcar;
- Determinar em escala laboratorial o melhor tempo de pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana desacetilado para obtenção do hidrolisado hemicelulósico;
- Avaliar em escala laboratorial o efeito da desacetilação alcalina sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana após pré-tratamento em ácido diluído;
- Efetuar a etapa de pré-tratamento em meio ácido do bagaço de cana em escala piloto, com e sem tratamento de desacetilação nas condições otimizadas, visando comparar a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos;
- Realizar estudos com endometabolômica através da identificação e quantificação de metabólitos produzidos por *Spathaspora passalidarum* durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos, visando compreender o papel dos inibidores na conversão de xilose e glicose a etanol.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 Procedimentos em escala laboratorial

Figura 1.13 - Fluxograma do experimento em escala laboratorial

Fonte: Arquivo pessoal.

7.1.1 Obtenção do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

Bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente cedida pela usina Pedra Agroindustrial, localizada na cidade de Serrana, SP, Brasil. O bagaço foi coletado na esteira de bagaço da usina. A palha foi cedida gentilmente pela fazenda Lagoa Seca, localizada em Piracicaba, Brasil e amostra coletada em fardo em local coberto, o qual foi obtido por colheita mecanizada da palha em campo. Antes do uso da palha no experimento, foi necessário picá-la manualmente, utilizando tesoura para reduzir o tamanho das partículas maiores. Bagaço e palha foram secos a temperatura e umidade ambiente para posterior armazenamento. Amostragem para os experimentos foi feita por quarteamento. A umidade das biomassas durante todo o experimento foi determinada em balança de umidade (Model MA35, Sartorius, Alemanha).

7.1.2 Reação com hidróxido de sódio (NaOH)

A condição de desacetilação em solução alcalina (0,4 % m/v NaOH; 70 °C; 3 h) teve como referência as condições otimizadas para palha de milho (CHEN et al., 2012b, d; CHEN et al., 2014; SHEKIRO III et al., 2014). Além disso, tendo como base essa condição como ponto central, foi feito um delineamento experimental em fatorial com design 2^3 , com um ponto central em triplicata, totalizando 11 unidades experimentais para bagaço e outros tantos para palha. Os fatores avaliados foram concentração de NaOH (0,1 %; 0,4 % e 0,7 %), temperatura (55 °C; 70 °C e 85 °C) e tempo (1 h; 3 h e 5 h).

Para as reações em NaOH, 25 g de biomassa (bagaço ou palha) foi transferido para reator de 0,5 L, onde foi adicionado 300 mL da solução alcalina, gerando uma razão sólido-líquido (S:L) de 1:12 (g/mL), tal qual empregado para palha de milho (CHEN et al., 2012b, d; CHEN et al., 2014; SHEKIRO III et al., 2014). O reator foi aquecido em banho de glicerina durante o tempo de residência da reação e resfriado por 10 minutos em banho com gelo para encerrar a reação. Em seguida, o conteúdo do reator foi vertido sobre malha de polipropileno para filtração. A fração sólida foi lavada exaustivamente com água da torneira para remoção de resíduos da solução.

Os procedimentos para reação em NaOH tiveram duas variantes. Em uma delas, o material de partida foi a biomassa bruta (bagaço ou palha) e o produto sólido lavado foi centrifugado por 10 minutos e seco em estufa a 55 °C. O sólido resultante desse procedimento foi usado para determinação gravimétrica do rendimento da reação, caracterização da composição química e análises por infravermelho. Na outra variante, a biomassa bruta foi moída por moinho de impacto e cisalhamento (Pulverisette 14, Fritsch, Alemanha) com peneira de controle de 0,2 mm. A biomassa moída foi então submetida às reações em NaOH com apenas três das diferentes condições, denominadas branda (0,1 % NaOH; 55 °C; 1 h), ponto central (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h) e severa (0,7 % NaOH; 55 °C; 1 h). Os sólidos lavados após essas reações foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), termoporometria por calorimetria diferencial de varredura (TCDV) e sorção dinâmica de vapor (SDV). A análise de TCDV requer amostras úmidas de 2-5 mg (base seca) e a moagem prévia gerou particulados suficientemente finos para viabilizar análises de TCDV com alíquotas úmidas representativas.

7.1.3 Composição química da biomassa

Para determinação de extrativos totais, 10 g de palha ou bagaço moídos foram adicionados em papel de filtro qualitativo e extraídos em ciclohexano-etanol na proporção 1:1 (v/v). Após extração completa, o material foi retirado e filtrado a vácuo em funil de Buchner. Posteriormente, a amostra foi seca a 105 °C em estufa até peso constante e então determinada a porcentagem de extrativos totais da seguinte forma:

$$E (\%) = \frac{M_{BSM} - M_{BE}}{M_{BSM}} \times 100$$

E: Teor de extrativos da biomassa, expresso em %;

M_{BSM}: Massa da biomassa seca e moída (g);

M_{BE}: Massa seca da biomassa livre de extrativos (g).

As cinzas totais foram determinadas com 0,5 g de biomassa adicionada em cadinho de porcelana e submetido a calcinação em mufla a 800 °C por 3 h. Os valores de cinzas totais foram obtidos pela diferença entre biomassa inicial e final após queima em mufla (ROCHA et al., 2011), usando a seguinte fórmula:

$$Cinzas\ totais\ (\%) = \frac{M_{cc} - M_c}{M_B} \times 100$$

Sendo:

M_c: Massa do cadinho de porcelana (g);

M_B: Massa de amostra inicial seca (g);

M_{cc}: Massa do cadinho de porcelana + cinzas totais (g).

As biomassas extraídas e desacetiladas foram caracterizadas para determinação da composição química do material, onde: 0, 3 g foram adicionados em tubos para hidrólise e em seguida acrescido 3 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m) em banho termostatzado a 30 °C por 1 h. Após período, foi inserido 84 mL de água destilada na mistura e o material autoclavado por mais 1 h a 121 °C (SLUITER et al., 2016). Ao fim dessa etapa, a mistura foi filtrada a vácuo em cadinho poroso de porcelana. O filtrado foi utilizado para determinação de concentração de açúcares e ácidos orgânicos por HPLC (Modelo Infinity

1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. Para os produtos de degradação, as concentrações de hidroximetilfurfural e furfural no filtrado foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4,8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm) (ROCHA et al., 2012a, 2015b).

Para determinação de lignina solúvel no filtrado, 1 mL da amostra ajustada para pH 12 com NaOH (6M) foi adicionada em balão volumétrico. O volume foi completo para 250 mL com água destilada e a solução resultante agitada. Após o período de agitação, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (LAMBDA 25, PerkinElmer, Estados Unidos) a 280 nm (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2012a). A concentração de lignina solúvel foi determinada de acordo com as equações modificadas por ROCHA et al. (2015).

Equação geral:

$$A_{280}: [(\varepsilon_L \times C_L) + (\varepsilon_{HMF} \times C_{HMF}) + (\varepsilon_{Furf} \times C_{Furf})]$$

$$A_{pd280} = [(C_{Furf} \times \varepsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF})]$$

$$C_{LS}: \left[\frac{(A_{280} - A_{pd280})}{\varepsilon_L} \right]$$

$$C_{LS} (g/L) = (4,187 \times 10^{-2} \times (A_{280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4})$$

Sendo:

C_{LS}: Concentração de lignina solúvel em g/L;

A₂₈₀: Absorbância total da solução obtida da hidrólise (lignina e os produtos de degradação) em 280 nm;

A_{pd280}: Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural), cujas as concentrações C_{furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por HPLC e ε_{furf} e ε_{HMF} são absorvidades e valem 146,85 e 114,00 L.g⁻¹ cm⁻¹, respectivamente.

ε_L: Absorvidade da lignina determinada em meio alcalino em 280 nm. O valor da absorvidade para a lignina do bagaço é de 23,7 g⁻¹ cm⁻¹ e para palha é de 19,6 g⁻¹ cm⁻¹.

Equação mais específica de acordo com a biomassa:

Equação analítica para palha de cana

$$C_{LS\text{palha}} = \frac{[A_{280} \cdot fd - [(C_{Furf} \times \varepsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF})]] - 0,031}{\varepsilon_L}$$

Equação analítica para o bagaço de cana

$$C_{LS\text{bagaço}} = \frac{[A_{280} \cdot fd - [(C_{Furf} \times \varepsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF})]] - 0,018}{\varepsilon_L}$$

In natura

$$L_S (\%) = \left[\frac{C_{LS} \left(\frac{g}{L} \right) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Pré-tratado

$$L_S (\%) = \left[\frac{C_{LS} \left(\frac{g}{L} \right) \times V(L)}{M_B} \right] \times 100$$

Onde:

L_S: Teor de lignina solúvel, expresso em porcentagem de massa por massa (% , m/m);

C_{LS}: Concentração de lignina solúvel, expressa em grama por litro (g/L);

fd: Fator de diluição utilizado;

V(L): Volume final da filtração (0,084 L), expresso em litro (L);

M_{BE}: Massa de biomassa livre de extrativos (g);

M_B: Massa de biomassa (g);

E: teor de extrativos totais, expresso em porcentagem de massa por massa (% , m/m);

Para determinação da lignina insolúvel e cinzas insolúveis, o material sólido retido no filtro dos cadinhos porosos resultante da hidrólise ácida foi seco em estufa a 105 °C, deixado atingir temperatura ambiente dentro de um dessecador e registrado a massa do cadinho de filtração contendo os sólidos em balança analítica (TE 214S, Sartorius, Brasil). Posteriormente, a biomassa foi calcinada em mufla a 800 °C por 3 h e então registrada, novamente, a massa do cadinho de porcelana poroso em balança. A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação a massa de amostra seca inicial com ou sem extrativos.

Os seguintes cálculos foram usados para determinação de cinzas insolúveis e lignina insolúvel de acordo com Rocha et al. (2015).

Cinzas insolúveis em meio ácido:

$$M_{\text{Cinzas}} \text{ (g)}: M_{\text{CPC}} - M_{\text{CP}}$$

M_{CPC}: Massa do cadinho de placa porosa com as cinzas (g);

M_{CP}: Massa do cadinho de placa porosa (g).

Lignina insolúvel em meio ácido para material *in natura*:

$$L_1(\%) = \left[\frac{M_{\text{CpR}} - (M_{\text{Cinzas}} + M_{\text{Cp}})}{M_{\text{BE}}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Lignina insolúvel em meio ácido para material pré-tratado:

$$L_1(\%) = \left[\frac{M_{\text{CpR}} - (M_{\text{Cinzas}} + M_{\text{Cp}})}{M_{\text{B}}} \right] \times 100$$

Sendo:

L₁: Teor de lignina insolúvel %;

M_{CpR}: Massa do cadinho de placa porosa com os resíduos sólidos (g);

M_{Cinzas}: Massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g);

M_{CP}: Massa de cadinho de placa porosa (g);

M_{BE}: Massa de biomassa livre de extrativos (g);

M_B: Massa de biomassa (g);

E: Teor de extrativos obtidos %.

Ao final das análises de cada componente presente na biomassa, foi realizada a determinação do balanço total, como os teores de celulose, hemicelulose e lignina total. As concentrações de glicose, celobiose e hidroximetilfurfural foram convertidos em celulose, tendo como base o fator de conversão de cada monômero 0,90; 0,95 e 1,29, respectivamente. Similarmente, xilose, arabinose e furfural com fatores de conversão 0,88 e 1,37 foram convertidos para hemicelulose. Ácido acético foi convertidos para grupos acetilas presente na hemicelulose com fator de conversão 0,72 (ROCHA et al., 2012a). As determinações de

lignina total tiveram como base a soma das porcentagens de lignina solúvel e insolúvel. As seguintes fórmulas foram usadas:

Lignina total:

$$L_T(\%) = L_I(\%) + L_S(\%)$$

L_T: Porcentagem de lignina total (%);

L_I: Porcentagem de lignina insolúvel (%);

L_S: Porcentagem de lignina solúvel (%).

Para material *in natura*:

$$Cel(\%) = \left[\frac{((0,90 \times C_{Gli}) + (0,95 \times C_{Celo}) + (1,29 \times C_{HMF}) + (3,53 \times C_{\text{Ácid fórm}})) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

$$Hemi(\%) = \left[\frac{((0,88 \times C_{Xil}) + (0,88 \times C_{Arab}) + (0,72 \times C_{\text{Ácid acéti}}) + (0,91 \times C_{\text{Ác. Gli}}) + (1,37 \times C_{Fur})) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Material pré-tratado:

$$Cel(\%) = \left[\frac{((0,90 \times C_{Gli}) + (0,95 \times C_{Celo}) + (1,29 \times C_{HMF}) + (3,53 \times C_{\text{Ácid fórm}})) \times V(L)}{M_B} \right] \times 100$$

$$Hemi(\%) = \left[\frac{((0,88 \times C_{Xil}) + (0,88 \times C_{Arab}) + (0,72 \times C_{\text{Ácid acéti}}) + (0,91 \times C_{\text{Ác. Gli}}) + (1,37 \times C_{Fur})) \times V(L)}{M_B} \right] \times 100$$

Onde:

Cel: Teor de celulose da biomassa, expresso em %;

C_{Gli}: Concentração de glicose (g/L);
C_{Celo}: Concentração de celobiose (g/L);
C_{HMF}: Concentração de hidroximetilfurfural (g/L);
C_{Ác. Fórm}: Concentração de ácido fórmico (g/L);
Hemi: Teor de hemicelulose da biomassa, expresso em %;
C_{Xil}: Concentração de xilose (g/L);
C_{Arab}: Concentração de arabinose (g/L);
C_{Ác Acét}: Concentração de Ácido acético (g/L);
C_{Ác Glic}: Concentração de Ácido Glicurônico (g/L);
C_{FUR}: Concentração de furfural (g/L);
V(L): Volume final da filtração (0,084L);
M_{BE}: Massa de biomassa livre de extrativos (g);
M_B: Massa de biomassa (g).

7.1.4 Determinação física da biomassa

7.1.4.1 Espectroscopia por infravermelho

Para caracterização por espectroscopia de infravermelho, as amostras secas ao ar foram moídas em moinho de impacto e cisalhamento (Pulverisette 14, Fritsch, Alemanha) com peneira de controle de 0,08 mm. Os espectros de infravermelho por transformação de Fourier (*FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy*) foram obtidos no instrumento Frontier (PerkinElmer, Estados Unidos) com acessório de refletância total atenuada universal (*ATR, attenuated total reflection*), empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe) recoberto com filme de diamante. Foram adquiridos espectros na faixa de 600-4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , intervalos de registro de 1 cm^{-1} e 16 varreduras por espectro. As amostras foram analisadas em triplicatas. O espectro branco foi adquirido sem amostra em contato com o cristal.

7.1.4.2 Difração de raios X

As amostras para difração de raios-X foram secas ao ar e acondicionadas em tubos capilares especiais para DRX (paredes de 0,01 mm espessura, 2 mm diâmetro, vidro especial, Charles Supper Company). A radiação Cu-K α ($\lambda=1.54\text{\AA}$) foi gerada em ultraX-18HF gerador de anodo rotacional com monocromador (VariMax HR optics, Rigaku). Para análise, o raio X incide ortogonalmente sobre o tubo capilar de vidro com amostra e posteriormente

os padrões de difração são detectados em placa detectora de imagens mar345 (Marresearch GmbH, Germany), posicionada a 120 mm dos tubos com amostras. Os padrões de difração bidimensionais foram calibrados, corrigidos e analisados pelo modelo CRAFS (Cellulose Rietveld Analysis for Fine Structure) (OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013), o qual, dentre outros parâmetros, determina a largura média dos cristais de celulose L_{200} . Essa largura é calculada como difração equatorial na intensidade L_{200} , a qual é bastante usada na literatura por ter pouca sobreposição de picos (DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011; OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013).

7.1.4.3 Sorção dinâmica de vapor

Isotermas de sorção foram determinadas pelo analisador de sorção (Q5000 SA, TA Instruments, Estados Unidos) em amostras úmidas sobre cadinho de quartzo metalizado. Em média, 8 mg de amostras úmidas foram adicionadas em cadinho de quartzo metalizado e analisado por 24 h. A análise foi executada a 50 °C com objetivo de acelerar o processo de adsorção e dessorção.

O método gravimétrico se baseia na determinação das massas das amostras em equilíbrio sobre diferentes pressões de vapor de água na etapa de adsorção e dessorção, visando avaliar a velocidade e a quantidade de solvente absorvido pela amostra. A amostra controle é preparada através da modulação entre fluxo de N_2 - sem vapor de água ($h=0$) e vapor de água saturada ($h=1$) (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). Caracterização da celulose por SDV fornecem muitos parâmetros que podem refletir as propriedades dos materiais (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). Os parâmetros avaliados foram os dados de equilíbrio (m_0 , ΔG_h e ΔG_d) ajustados pelo modelo HH (‘‘Hailwood–Horrobin sorption model’’). m_0 é a monocama de água que satura a superfície de sorção e dessorção, ΔG_h é o equilíbrio da monocamada de hidratação, sendo que quanto mais negativo reflete a superfície hidrofílica da celulose e ΔG_d é a constante de dissolução da monocamada, sendo que quanto mais positivo reflete maior resistência à expansão volumétrica necessária para dissolver água (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012).

7.1.4.4 Termoporometria

As análises de termoporometria seguiram o protocolo estabelecido por Driemeier, Mendes e oliveira (2012), onde 16 mg de cada biomassa úmida foram analisadas pelo Calorímetro Diferencial de Varredura – TCDV (DSC Q200, TA Instruments, Estados

Unidos) por 6 h. Para análise por TCDV, a amostra é submetida ao congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de isoterma por 15 minutos para equilíbrio do sistema e garantia de congelamento da amostra. As etapas subsequentes são de aquecimento sequencial das amostras em 18 etapas até chegar a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ com intervalos de isoterma para determinação do fluxo de calor em função do tempo para cada etapa.

O método tem como princípio para detecção de tamanho e distribuição de poros, que em confinamento nanométrico, as transições de fases da água ocorrem em temperaturas deslocadas para aquelas sem confinamento. O TCDV diferencia três tipos de água conforme sua interação com os poros, 1) água livre (água fora dos poros e com temperatura de fusão a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$); 2) água confinada congelável (água presente dentro dos poros e que são responsáveis pelo deslocamento da temperatura de transição sólido-líquido abaixo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 3) água não congelável (camada líquida de água que permanece na parede dos poros e na superfície do gelo do interior dos poros, com difícil mensuração). O sinal calorimétrico de derretimento do gelo em cada etapa de aquecimento é convertido para massa de gelo derretido (M_i) pela seguinte fórmula:

$$M_i = \frac{Q_i - C_i \cdot \delta T}{q_i}$$

Onde, Q_i é o calor mensurado em cada passo de aquecimento, C_i capacidade calorífica da amostra, δT variação de temperatura no passo de aquecimento e q_i é a entalpia de fusão do gelo. A diferença entre o peso do cadinho nas etapas iniciais e finais da análise registra a massa de água que havia na amostra e massa seca da amostra, o que resulta no valor cumulativo de água confinada (g massa de água/g biomassa seca), em função de um diâmetro equivalente dos poros. O diâmetro de poros, d , é calculada pela seguinte equação, considerando poros cilíndricos:

$$d = -\frac{2K_c}{\Delta T}$$

Onde, a redução da temperatura de fusão do gelo ΔT é relatado a um diâmetro de poro, d , com K_c : 19,8 nmK (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012).

7.1.5 Pré-tratamento em meio ácido do bagaço desacetilado e não desacetilado

Após encontrar a melhor condição de desacetilação apenas para o bagaço em escala laboratorial (0,4 % NaOH; $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3 h), foi realizado um experimento de pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído fixando a temperatura ($140\text{ }^{\circ}\text{C}$), concentração de ácido (0,5 %

H₂SO₄) e variando apenas o tempo da reação (10, 15 e 20 minutos) em duplicata. Os parâmetros avaliados nessa etapa foram rendimento de biomassa, composição química do material sólido e do hidrolisado após pré-tratamento. Dessa forma, 30 g de bagaço bruto ou desacetilado foi transferido para reator de 0,5 L, onde foi adicionado 300 mL da solução de ácido sulfúrico (0,5 % v/v, H₂SO₄), gerando uma razão sólido-líquido (S:L) de 1:10 (m/v). O reator foi aquecido em banho de glicerina durante o tempo de residência da reação (10, 15 e 20 minutos) a 140 °C. Após a reação, o reator foi resfriado por 10 minutos em banho com gelo e em seguida, o conteúdo do reator foi vertido sobre malha de polipropileno para filtração. Na fração líquida foi determinado xilose, glicose, arabinose, ácido acético e celobiose por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD). Para determinação de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos, foi utilizado uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4, 8 mm, Thermo). A fração sólida foi lavada exaustivamente com água da torneira para remoção de resíduos da solução, seca em temperatura ambiente e posteriormente caracterizada de acordo com as especificações mencionadas anteriormente (*Seção 7.1.3 Composição química da biomassa*) (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2012b, 2015b).

7.1.6 Hidrólise enzimática do material pré-tratado

Para os ensaios de hidrólise enzimática, as biomassas úmidas tiveram o pH corrigido para 5,0 com solução de NaOH. Em seguida após correção do pH e determinação da umidade do material, 5 g de biomassa (massa seca) foram adicionados em frascos rosqueados de 100 mL, em seguida acrescido 10 mL de solução tampão citrato de sódio (500 mM Na-Citrato) e em torno de 0,21 mL de celulase comercial (Cellic® CTec2) e a solução final foi completo para 50 mL com água destilada. A reação ocorreu a 50 °C, 200 rpm de agitação em pH 5,0 e concentração enzimática de 10FPU/ g de glucana com razão sólido-líquido, 1:10 (m/v). As reações foram executadas por 72 horas em triplicata com ponto de coleta a cada 8 e 16 horas (NAKANISHI et al., 2017; SILVA et al., 2016). Após cada período, amostras foram centrifugas por 10 minutos a 4000 rpm em Microcentrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5424 R) e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de glicose por HPLC. A porcentagem de conversão de glucana em glicose após hidrólise enzimática foi calculada de acordo com os procedimento de Nakanishi et al. (2017).

7.2 PROCEDIMENTOS EM ESCALA PILOTO

7.2.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico e fermentação

Figura 1.14 - Fluxograma do experimento em escala piloto

Fonte: Arquivo pessoal

7.2.1.1 Desacetilação do bagaço e pré-tratamento em H₂SO₄

A desacetilação do bagaço com NaOH foi executado na planta piloto do LNBR da seguinte forma: inicialmente, bagaço foi adicionado em reator de 350 L (Pope Scientific inc, Saukville, USA) e adicionado solução de NaOH (0,4 % m/v) na proporção S:L, 1:12. A reação ocorreu em pressão atmosférica, 70 °C por 3 h. Após o fim da reação, o material sólido foi lavado e retirada uma alíquota para caracterização. Posteriormente, bagaço desacetilado (50 % m/m, conteúdo de umidade) foi transferido, novamente, para reator de liga metálica de 350 L e adicionado ácido sulfúrico diluído (0,5 %, v/v) na proporção S:L, 1:10 (SANTORO et al., 2015). A reação foi executada a 140 °C por 15 minutos e com 150 rpm de agitação. O tratamento controle (bagaço não desacetilado) foi realizado nas mesmas condições, porém sem etapa de desacetilação alcalina. Ao fim da reação, o reator foi resfriado, despressurizado e aberto. Ambos os hidrolisados hemicelulósicos foram separados

do bagaço por filtração (Nutsche filter, Pope Scientific inc, Saukville, USA) e concentrado 9 vezes por evaporador de filme seco (Pope Scientific inc, Saukville, USA) e armazenado em um recipiente refrigerado até uso.

7.2.1.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico e caracterização

Para a execução dos experimentos das fermentações, os hidrolisados concentrados foram processados da seguinte forma: o hidrolisado desacetilado e controle foram caracterizados por HPLC, ajustado entre pH 4,5-5 com NaOH e autoclavado a 110 °C por 15 minutos. Posteriormente, os licores foram centrifugados a 7000 rpm por 20 minutos para remoção do material sólido formado. Em seguida, foram novamente caracterizados e congelados para uso até as fermentações (NAKANISHI et al., 2017).

As concentrações de carboidratos solúveis e ácidos orgânicos foram determinados nos hidrolisados concentrados e após processado por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. As concentrações de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4,8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm) (ROCHA et al., 2012a, 2015b).

7.2.1.3 Obtenção do isolado e identificação molecular

Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907 obtida de solução estoque com glicerol (50 %) a -80 °C foram cultivadas em meio YPDX Ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de Ágar) e, após incubação em estufa a 30 °C por 24 h, uma colônia foi transferida para 100 mL de meio líquido de mesma composição, porém sem ágar e novamente incubado a 30 °C em estufa por mais 24 h a 200 rpm. Para a identificação molecular, o meio de cultivo líquido foi centrifugado em tubos falcon de 15 mL a 14000 rpm por 10 minutos para obtenção do pellet de levedura. Os tubos falcon com pellet foi armazenado em isopor com gelo até o momento da extração do DNA total.

A extração de DNA total foi executada por meio de um KIT Fast DNA for Soil da MPbio, o qual é composto de solução para lise da célula, membrana de sílica para adsorção

do DNA, solução para precipitação de proteínas, tratamento com RNase, solução de neutralização e reagente para precipitação do DNA. Após obtenção do DNA, o material foi submetido a reação por PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA, usando primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Em seguida, o produto de PCR foi purificado, quantificado em nanodrop, bandas analisadas em gel de agarose (1 %) para confirmação do tamanho esperado e posteriormente executado o sequenciamento pela metodologia de Sanger. As sequências obtidas foram montadas e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados (GenBank, NCBI), usando o algoritmo BLASTn. As sequências analisadas apresentaram 99,8 % com as sequências ITS de *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345 from TYPE material, sendo caracterizada como mesma espécie.

7.2.1.4 Microrganismo e preparo do inóculo

S. passalidarum, previamente identificada molecularmente, foram mantidas em estoque em meio líquido YPDx e glicerol (50 %) a -80 °C. Em seguida, as linhagens foram cultivadas separadamente em meio YPDx Ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de Ágar) e, após incubado em estufa a 30 °C por 48h. Em seguida, 180 mL de inóculo foi preparado em duplicata em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura, 10; peptona, 20; uréia, 2,4; KH₂PO₄, 5; MgSO₄•7H₂O, 1; xilose, 10 e glicose, 12. Uma colônia foi transferida para o meio inóculo e incubada por 48 h, 200 rpm e 30 °C (LONG et al., 2012; SANTOS et al., 2016).

7.2.1.5 Propagação

A propagação das células foi realizada em um volume total de 3,6 L em biorreator de 7 L (New Brunswick, Bioflo 115). A propagação foi separada em três etapas: 1) fase batelada, 2) administração de pulso e 2) fase batelada alimentada, com tempo total de 60 h, sendo de aproximadamente 20 h para a fase batelada e cerca de 40 h para a fase de alimentação (LONG et al., 2012). O meio de crescimento na fase batelada conteve (g.L⁻¹): xilose (15), glicose (15), KH₂PO₄ (2,0), uréia (2,4), extrato de levedura (3,0) e MgSO₄.7H₂O (1,0) (LONG et al., 2012). Após 20 h do consumo total dos açúcares, foi adicionado um pulso de KH₂PO₄ (2,0 g.L⁻¹) e de uréia (5,0 g.L⁻¹) e a alimentação ligada. O meio de alimentação conteve (g.L⁻¹): extrato de levedura, (3); peptona, (5); xilose, (63,89) e glicose, (63,89) (SANTOS et al., 2016). A porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida entre

40 % e 50 % da saturação para evitar a limitação de oxigênio durante toda etapa de propagação. Após o tempo de propagação (60 h), a alimentação foi interrompida, o meio rico em leveduras centrifugado de maneira estéril a 8000 rpm por 20 min. Após a centrifugação, as leveduras foram ressuspensas em água estéril de torneira e usadas para as fermentações (SANTOS et al., 2016).

7.2.1.6 Fermentação

A fermentação em batelada foi realizada de acordo com o protocolo de Santos et al. (2016) modificado para biorreator de 1,5 L (New Brunswick, Bioflo 115), previamente esterilizado a 121 °C durante 20 min e com volume fixo de 0,7 L. Após esterilização, a água foi drenada por meio de bomba peristáltica e o creme de levedura transferido para o biorreator, representando 1/3 (v/v) do volume final de trabalho. Em seguida, o hidrolisado hemicelulósico (desacetilado e não desacetilado) com padronização por concentração de glicose e xilose foi utilizado para fermentação. O meio para fermentação foi composto por (g.L⁻¹): glicose, (45); xilose, (77); KH₂PO₄, (3); MgSO₄.7H₂O, (1); uréia, (2,4) e extrato de levedura, (10). As fermentações foram realizadas a 30 °C, pH entre 4,5-5, 200 rpm de agitação, 20 g.L⁻¹ de células no início das fermentações e com aeração (0,14 vvm). Todos os experimentos foram realizados em três repetições biológicas. As fermentações foram executadas por 72 h com períodos de coleta de 12 h. Durante cada período, foram avaliados massa seca, HPLC e viabilidade celular. Os tempos de 0, 4, 8 e 12 h foram escolhidos para análise de metabolômica por LC-MS.

7.2.1.6.1 Procedimentos analíticos

7.2.1.6.2 Determinação de massa seca

2 mL de amostra foram adicionados em tubos ependdorfs de mesmo volume e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos em Micro Centrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5424 R). Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do pellet para análise por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos) e o pellet resultante no tubo, resuspendido em 2 mL de água destilada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos com pellets seco em estufa a 80 °C até peso constante. Ao final da secagem, a massa seca de células foi determinada pela diferença de peso entre tubo ependdorf vazio e com pellet de células após secagem (SANTOS et al., 2016).

7.2.1.6.3 Viabilidade celular e brotamento

A viabilidade e o brotamento das células foram determinados pela coloração das leveduras em azul de metileno (0,02 %, m/v) e contagem em diagonal das células vivas, mortas, broto vivo e morto em câmara de Neubauer com microscópio óptico e objetiva de 40x (GILLILAND, 1959). Os resultados foram expressos em porcentagens, sendo que a viabilidade representa a relação entre células vivas e total de células contadas (1) e o brotamento entre broto vivo e total de células vivas (2).

$$Viabilidade(\%) = \frac{Células\ vivas}{C.vivas+C.mortas} \times 100 \quad (1)$$

$$Brotamento(\%) = \frac{Broto\ vivo}{C.vivas} \times 100 \quad (2)$$

7.2.1.6.4 Análise de metabólitos

As concentrações de carboidratos solúveis, álcoois e ácidos orgânicos foram determinados no sobrenadante por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. As concentrações de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos no hidrolisado foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4, 8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm) (ROCHA et al., 2012a, 2015b).

7.2.1.6.5 Cálculos dos parâmetros cinéticos

A produtividade volumétrica de etanol (Q_P), rendimento (Y_{P/S}), porcentagem de consumo de açúcares (SC) e eficiência de fermentação (FE) foram calculados de acordo com as seguintes equações (3), (4), (5) e (6):

$$Q_P = \frac{[E]_f - [E]_0}{t_f - t_0} \quad (3)$$

Onde [E]_f e [E]₀ referem-se à concentração de etanol final e inicial das fermentações e t_f e t₀ aos tempos finais e iniciais das fermentações, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{[E]_f - [E]_0}{[S]_0 - [S]_f} \quad (4)$$

Sendo que $[S]_0$ e $[S]_f$ referem-se as concentrações iniciais e finais de açúcar (xilose ou glicose), respectivamente.

$$SC (\%) = \frac{[S]_0 - [S]_f}{[S]_0} \times 100 \quad (5)$$

$$FE (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (6)$$

O valor 0.511 g.g^{-1} corresponde a conversão estequiométrica de xilose e glicose em etanol por *S. passalidarum* (SANTOS et al., 2016).

7.2.1.7 Endometabolômica e pontos de coleta

As amostras para metabolômica foram retiradas nas 12 horas iniciais com intervalo de 4 h (0, 4, 8 e 12 h). Esse período foi escolhido por representar a fase lag, onde a levedura está se adaptando aos licores e sofrendo maior estresse. Para estudos com endometabolômica, visando avaliar inibidores, esse período é o mais utilizado na literatura (DING et al., 2011a; DING; ZHOU; YUAN, 2010; WANG et al., 2013, 2014).

7.2.1.8 Amostragem, quenching e extração

O quenching celular foi realizado com solução MeOH:H₂O 60 % a -40 °C, sendo mantido em banho criogênico de acetonitrila com gelo seco. Dessa forma, 4 mL de meio de cultivo foram adicionados em 20 mL de solução de quenching a -40 °C e mantido a essa temperatura por 3 minutos e, então, centrifugados por 3 minutos a 3200 g e -9 °C. Aos pellets centrifugados após quenching, foram adicionados 5 mL da solução de extração (Etanol: H₂O 75 % e tampão HEPES 10 mM pH 7,5) e mantidos a 80 °C por 3 minutos. Após esse período, amostras foram transferidas para o banho criogênico a -40 °C por 3 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 4000 g e -9 °C. Os sobrenadantes foram estocados a -80 °C. As amostras foram concentradas em SpeedVac, os volumes ajustados para 0,2 mL com água ultrapura e estocadas em freezer a -80 °C até análise (CANELAS et al., 2008; CARNEIRO; PEREIRA; ROCHA, 2014; GONZALEZ; FRANÇOIS; RENAUD, 1997).

REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. M. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 22, p. 1–9, 2014.
- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. ALD5, PAD1, ATF1 and ATF2 facilitate the catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 723–727, 2007.
- ALKIMIM, A.; SPAROVEK, G.; CLARKE, K. C. Converting Brazil's pastures to cropland: An alternative way to meet sugarcane demand and to spare forestlands. **Applied Geography**, v. 62, p. 75–84, 2015.
- ALLEN, S. A et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–10, 2010.
- ANOVITZ, L. M.; COLE, D. R. Characterization and Analysis of Porosity and Pore Structures. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 80, n. 1, p. 61–164, 2015.
- ASK, M. et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 22, p. 1–13, 2013.
- AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 8–19, 1995.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, 2015.
- BARROS, S. **USDA Biofuels Annual Biofuels Report**. São Paulo: USDA Foreign Agricultural Service, 2017.
- BELLIDO, C. et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10868–10874, 2011.
- BIORENDER. **BioRender**. Disponível em: <https://biorender.com/>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BRASIL. Lei n. 13.576, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 4, 27 dez. 2017.
- CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2012.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421–431, fev. 2013.

CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–14, 2016.

CANELAS, A. B. et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. **Metabolomics**, v. 4, n. 3, p. 226–239, 2008.

CANELAS, A. B. et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 17, p. 7379–7389, 2009.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 84–92, 2010.

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

CANUTO, G. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2017.

CARDOSO, T. F. et al. Technical and economic assessment of trash recovery in the sugarcane bioenergy production system. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 353–360, 2013.

CARNEIRO, S.; PEREIRA, R.; ROCHA, I. Yeast metabolomics: sample preparation for a GC/MS-based analysis. In: MAPELLI, V. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2014. p. 197–207.

CARVALHO, D. M. et al. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223–234, 2017a.

CARVALHO, J. L. N. et al. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 7, p. 1181–1195, 2017b.

CASTRO, R. C. A. et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 1, p. 1–9, 2016.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.

CHANDEL, A. K. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces*

cerevisiae. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, p. 1–15, 2013.

CHEN, H. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014.

CHEN, X. et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) experimental. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–10, 2012a.

CHEN, X. et al. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 70–76, 2012b.

CHEN, X. et al. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–14, 2012c.

CHEN, X. et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–11, 2014.

CHEN, X. et al. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g/L) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (>10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. **Energy & Environmental Science**, v. 9, p. 1237–1245, 2016a.

CHEN, Y. et al. Transcriptional profiling reveals molecular basis and novel genetic targets for improved resistance to multiple fermentation inhibitors in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–18, 2016b.

CHENG, K.-K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008.

CLEARFIELD, A.; REIBENSPIES, J. H.; BHUVANESH, N. **Principles and Applications of Powder Diffraction**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Brasília, DF: CONAB, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF: CONAB, 2019.

CRUTCHFIELD, C. A. et al. Mass spectrometry-based metabolomics of yeast. In: WEISSMAN, J.; GUTHRIE, C.; FINK, G. R. (Eds.). **Guide to yeast genetics: functional genomics, proteomics, and other systems analysis**. 2nd ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2010. p. 393–426.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015a.

DEL RÍO, J. C. et al. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw.

Industrial Crops and Products, v. 77, p. 992–1000, 2015b.

DIAS, M. O. DE S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8964–8971, 2011.

DING, M.-Z. et al. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 15, p. 647–653, 2011a.

DING, M.-Z. et al. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation. **Metabolomics**, v. 8, p. 232–243, 2012.

DING, M. Z. et al. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **Omics**, v. 15, p. 647–653, 2011b.

DING, M. Z.; ZHOU, X.; YUAN, Y. J. Metabolome profiling reveals adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* during repeated vacuum fermentations. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 42–55, 2010.

DRIEMEIER, C. et al. Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**, v. 18, p. 1509–1519, 2011.

DRIEMEIER, C. et al. Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v. 22, p. 2183–2195, 2015.

DRIEMEIER, C. Nanostructure of lignocellulose and its importance for biomass conversion into chemicals and biofuels. In: BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, A. P. DE (Eds.). **Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane**. Cham: Springer international publishing, 2017. p. 21–38.

DRIEMEIER, C.; BRAGATTO, J. Crystallite width determines monolayer hydration across a wide spectrum of celluloses isolated from plants. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 415–421, 2013.

DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, G. A. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, p. 184–192, 2011.

DRIEMEIER, C.; FRANCISCO, L. H. X-ray diffraction from faulted cellulose I constructed with mixed I α –I β stacking. **Cellulose**, v. 21, n. 5, p. 3161–3169, 2014.

DRIEMEIER, C.; MENDES, F. M.; OLIVEIRA, M. M. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. **Cellulose**, v. 19, p. 1051–1063, 2012.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S. Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 114–117, 2016.

DUSSÁN, K. J. et al. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from

sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, v. 87, p. 703–710, 2016.

EGESKOG, A. et al. Greenhouse gas balances and land use changes associated with the planned expansion (to 2020) of the sugarcane ethanol industry in Sao Paulo, Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 280–290, 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547–554, 2011.

FITZGERALD, D. J. et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 104–113, 2004.

GILLILAND, R. B. Determination of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 65, n. 5, p. 424–429, 1959.

GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J.; RENAUD, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. **Yeast**, v. 13, n. 14, p. 1347–1356, 1997.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500–1503, 2009.

GUBICZA, K. et al. Techno-economic analysis of ethanol production from sugarcane bagasse using a liquefaction plus simultaneous Saccharification and co-fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 42–48, 2016.

GÜNAN YÜCEL, H.; AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. **Fuel**, v. 158, p. 793–799, 2015.

GUO, Z.; OLSSON, L. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 1234–1248, 2014.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.

HASUNUMA, T. et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2011.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832, 2005.

- HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. **Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 2009.
- HITTINGER, C. T. et al. Genomics and the making of yeast biodiversity. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 100–109, 2015.
- HOOGWIJK, M. et al. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 2, p. 119–133, 2003.
- HORVÁTH, I. S. et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, p. 4076–4086, 2003.
- HOU, X.; YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2591–2601, 2012.
- HUANG, C.-F. et al. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3914–3920, 2009.
- JANSEN, M. L. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 5, p. 1–20, 2017.
- JONKER, J. G. G. et al. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593–610, 2015.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1–10, 2013.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.
- JORDÀ, J. et al. Glucose-methanol co-utilization in *Pichia pastoris* studied by metabolomics and instationary ¹³C flux analysis. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 17, p. 1–17, 2013.
- JU, Y. H. et al. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 591–599, 2011.
- KANG, X. et al. Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. **Nature Communications**, v. 10, n. 347, p. 1–9, 2019.
- KEATING, J. D.; PANGANIBAN, C.; MANSFIELD, S. D. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 1196–1206, 2006.
- KHATIWADA, D. et al. Power generation from sugarcane biomass – a complementary

option to hydroelectricity in Nepal and Brazil. **Energy**, v. 48, n. 1, p. 241–254, 2012.

KHATIWADA, D. et al. Optimizing ethanol and bioelectricity production in sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable Energy**, v. 85, p. 371–386, 2016.

KILIAN, S. G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5–6, p. 545–548, fev. 1988.

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

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4950–4962, 2011.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1–27, 2011.

KUNDU, C.; LEE, H. J.; LEE, J. W. Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 28–35, 2015.

LABORATÓRIO NACIONAL DE BIORRENOVÁVEIS. **Cartilha da Bioeletricidade**. Campinas, SP: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2017.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 511–525, 2009.

LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 466–489, 2017.

LIMA, C. S. et al. Multiscale alterations in sugar cane cagasse and straw submitted to alkaline deacetylation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3796–3804, 2018.

LIU, C. G. et al. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 257–265, 2013.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, 2011.

LONG, T. M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, p. 5492–5500, 2012.

LOUËR, D. Powder x-ray Diffraction, applications. In: LINDON, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. [s.l.]: Elsevier, 2017. p. 723–731.

LUCAS, C.; VAN UDEN, N. Transport of hemicellulose monomers in the xylose-

fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 491–495, 1986.

LV, Y.-J. et al. Proteomic analysis reveals complex metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells against multiple inhibitors stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 2207–2221, 2014.

MANDEGARI, M. A.; FARZAD, S.; GÖRGENS, J. F. Recent trends on techno-economic assessment (TEA) of sugarcane biorefineries. **Biofuel Research Journal**, v. 4, n. 3, p. 704–712, 2017.

MARQUES, F. Obstáculos no caminho. **Revista Pesquisa Fapesp**, p. 58–63, 2018.

MARTIEN, J. I.; AMADOR-NOGUEZ, D. Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 118–126, 2017.

MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 345–352, 2013.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, p. 597–609, 2015.

MENANDRO, L. M. S. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 488–504, 2017.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769–776, 2002.

MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

MORALES, P. et al. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 5–11, 2017.

MORIYA, R. Y.; GONÇALVES, A. R.; DUARTE, M. C. T. Ethanol/water pulps from sugar cane straw and their biobleaching with xylanase from *Bacillus pumilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, p. 501–513, 2007.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MOYSÉS, D. N. et al. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1–18, 2016.

NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production

from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

NEGRO, M. J. et al. Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 101–107, 2014.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232–1241, 2006.

NUNES, R. DE M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–123, 2013.

OLIVEIRA, R. P.; DRIEMEIER, C. CRAFS: A model to analyze two-dimensional X-ray diffraction patterns of plant cellulose. **Journal of Applied Crystallography**, v. 46, p. 1196–1210, 2013.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 375–380, 1990.

PARIKKA, M. Global biomass fuel resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 6, p. 613–620, 2004.

PEREIRA, S. C. et al. Physical–chemical–morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. **Renewable Energy**, v. 87, p. 607–617, 2016.

RAÍZEN. **Relatório anual 2018**. Piracicaba; SP, 2018. p. 94.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.

REN, S. et al. Computational and statistical analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 11, n. 6, p. 1492–1513, 2015.

REZENDE, C. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.

REZENDE, C. C.; PIMENTA, M. T. B. **Fracionamento por peneiras do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção das frações fibra e medula**. Campinas, SP: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2015.

RILEY, R. et al. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 35, p. 9882–9887, 2016.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663–670, 2011.

- ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015a.
- ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274–279, 2012a.
- ROCHA, G. J. M. et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012b.
- ROCHA, G. J. M. et al. Effect of xylan and Lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. **Sugar Tech**, v. 15, p. 390–398, 2013.
- ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015b.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: PÉTER, G.; ROSA, C. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 101–121.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008.
- SAAD, M. B. W. et al. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 220–225, 2008.
- SALVACHÚA, D. et al. Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 28, p. 1–15, 2016a.
- SALVACHÚA, D. et al. Succinic acid production from lignocellulosic hydrolysate by *Basfia succiniciproducens*. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 558–566, 2016b.
- SÀNCHEZ NOGUÉ, V.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 761–772, 2015.
- SANTORO, D. C. J. et al. Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 37., 2015, San Diego. **Conference**. San Diego: CA, 2015. Disponível em: <https://sim.confex.com/sim/37th/webprogram/Paper29451.html>. Acesso em: 9 abr. 2019
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, S. C. et al. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 319–329, 2016.

- SCORDIA, D.; COSENTINO, S. L.; JEFFRIES, T. W. Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus × giganteus* biomass for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 540–548, 2013.
- SENATHAM, S. et al. Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1040, p. 1–8, 2016.
- SHEKIRO III, J. et al. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–10, 2014.
- SHEKIRO III, J. et al. Development and characterization of a high-solids deacetylation process. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, p. 1–10, 2016.
- SILVA, A. S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402–7409, 2010.
- SILVA, V. F. et al. Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1853–1859, 2016.
- SKAAR, C. **Wood-Water Relations**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988.
- SLUITER, J. B. et al. Evaluation of brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 579–585, 2016.
- SPICER, R. et al. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, n. 106, p. 1–16, 2017.
- STOUTENBURG, R. M. et al. Ethanol production from a membrane purified hemicellulosic hydrolysate derived from sugar maple by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1349–1358, 2008.
- SU, Y. K.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 457–469, 2015.
- SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.
- TEN, E.; VERMERRIS, W. Recent developments in polymers derived from industrial lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 1–13, 2015.
- THORNLEY, P. et al. Maximizing the greenhouse gas reductions from biomass: the role

of life cycle assessment. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 35–43, 2015.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Relatório final da safra 2015/2016**. São Paulo: UNICA, 2016.

VAN DER POL, E. C. et al. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579–9593, 2014.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1155–1169, 2005.

WANG, X. et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 17, p. 150–159, 2013.

WANG, X. et al. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 152–164, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–217, 2005.

XU, J. et al. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC-MS based metabolomics. **Food Chemistry**, v. 186, p. 176–184, 2015.

YANG, J. et al. Integrated phospholipidomics and transcriptomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced tolerance to a mixture of acetic acid, furfural, and phenol. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 16, n. 7–8, p. 374–386, 2012.

YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1–24, 2010.

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.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475–501, 2017.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465–482, 2012a.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p. 561–579, 2012b.

ZHU, H. J. et al. Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and biofertilizer production. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 257–266, 2013.

ZHU, J.-J. et al. Adaptation fermentation of *Pichia stipitis* and combination detoxification on steam exploded lignocellulosic prehydrolyzate. **Natural Science**, v. 01, n. 01, p. 47–54, 2009.

CAPÍTULO 2: Manuscrito publicado na ACS Sustainable Chemistry & Engineering

Alterações multiescala em bagaço e palha de cana-de-açúcar submetidos a desacetilação alcalina

Cleilton Santos Lima^{1,2}, Sarita Rabelo¹, Peter N. Ciesielski³, Inês C. Roberto², George J. M. Rocha² e Carlos Driemeier^{1*}

(1) Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), Centro Nacional de Pesquisas em Energias e Materiais (CNPEN), CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil;

(2) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12602-810 Lorena, São Paulo, Brazil;

(3) Biosciences Center, National Renewable Energy Laboratory, 15013 Denver West Parkway, Golden, Colorado 80401, United States.

Resumo

A desacetilação alcalina tem surgido como pré-tratamento químico promissor anterior à sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica. Tal processo reduz custos com pressurização de reatores e abre novas oportunidades para a covalorização da lignina. Nesse trabalho, foi avaliado a resposta química e morfológica do bagaço e da palha de cana-de-açúcar submetidos a várias condições alcalinas. Foram avaliados em delineamento experimental 2³, a condição ponto central (0,4 % m/v NaOH, 70 °C, 3 h), bem como condições próximas (0,1-0,7 % NaOH, 55-85 °C, 1-5 h). O tratamento alcalino removeu 90 % dos grupos acetilas e entre 20-30 % da lignina do bagaço e da palha, enquanto que a remoção de 20 % de xilana e de glucana é observada apenas na palha, mas não no bagaço. Considerando as alterações em nanoescala, nem a cocristalização da celulose (avaliada por difração de raios X), nem a formação de agregados de lignina (avaliadas por assinatura termoporométrica) são observados após os tratamentos alcalinos. Além disso, a termoporometria calorimétrica, bem como as microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão, mostraram uma notável abertura dos poros em nanoescala e o afrouxamento das estruturas da parede celular e consequentemente dos tecidos, indicando desejável enfraquecimento mecânico e ganhos na acessibilidade das enzimas. Tais resultados fornecem conhecimentos fundamentais e práticos para biorrefinarias baseadas na desacetilação alcalina do bagaço e da palha de cana.

Palavras-chave: Bagaço; cana-de-açúcar; desacetilação; palha; pré-tratamento.

*Email: carlos.driemeier@lnbr.cnpem.br

1 Introdução

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundante no planeta terra com potencial para substituir uma parte considerável da demanda global por combustíveis fósseis (HOOGWIJK et al., 2003; PARIKKA, 2004). A cana-de-açúcar é, especialmente, bem posicionada, devido à alta produtividade e sistema de bioenergia consolidado, sobretudo no Brasil (CORTEZ, 2014; DIAS et al., 2015). Historicamente, os principais produtos da cana-de-açúcar foram derivados a partir dos açúcares solúveis do caldo. Tais açúcares fazem parte de aproximadamente 1/3 da biomassa seca da planta e os outros 2/3 são resíduos lignocelulósicos: o bagaço e a palha. O bagaço é o resíduo fibroso obtido após a moagem da cana para a extração do caldo (CORTEZ, 2014; DIAS et al., 2015). Tal subproduto é usado na usina como combustível sólido para gerar calor e energia, mas uma grande parte pode ser disponibilizada para outras finalidades (JUNQUEIRA et al., 2017; SOCCOL et al., 2010). A palha é composta de folhas verdes, secas e ponteiros, os quais são disponíveis no campo após colheita mecanizada da cana. Parte da palha deve permanecer no campo para reciclagem de nutrientes e proteção do solo, enquanto parte pode ser coletada e transportada para a usina (MENANDRO et al., 2017). Portanto, tanto o bagaço quanto a palha são matérias-primas lignocelulósicas disponíveis para conversão química e bioquímica (JUNQUEIRA et al., 2017).

Em biorrefinarias avançadas, a biomassa lignocelulósica é convertida em uma gama de produtos, tendo biocombustíveis líquidos, como o etanol celulósico, como o produto de alto volume. O pré-tratamento da biomassa é o primeiro passo crítico e restringe todos os processos posteriores (DE LIMA et al., 2016; MOSIER, 2005a). Atualmente, existem várias instalações comerciais pioneiras produzindo etanol celulósico em todo o mundo (LYND et al., 2017a; NOVACANA, 2016). A maioria dessas instalações pioneiras empregam pré-tratamento por explosão a vapor ou ácido diluído (DE LIMA et al., 2016; LYND et al., 2017a; NOVACANA, 2016). Tais classes de pré-tratamento expõem a biomassa a ambientes aquosos e ácidos sob alta pressão e temperatura (140-200 °C). É conhecido que tais tratamentos (com e sem catálise ácida) possui uma faixa contínua de pH e promove mudanças morfológicas comuns na biomassa e pode ser agrupado, geralmente, como pré-tratamento hidrotérmico. Essa classe de pré-tratamento, preferencialmente, hidrolisa e solubiliza a hemicelulose, sendo efetivo em desconstruir a biomassa e reduzir a recalcitrância (ROCHA et al., 2015b; RUIZ et al., 2013).

Uma vez que os pré-tratamentos hidrotérmicos são empregados em escala comercial, as vantagens e desvantagens são claramente diagnosticadas e fornecem oportunidades para novos conceitos. A desvantagem do processo hidrotérmico, incluem formação de compostos tóxicos para fermentação (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; MUSSATTO; ROBERTO, 2004), condensação química da lignina, as quais dificultam a conversão em químicos de valor agregado (NARRON et al., 2016; TRAJANO et al., 2013) e alta temperatura induz o fenômeno da cocrystalização da celulose (DRIEMEIER et al., 2015; LANGAN et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016) e agregação de lignina (DONALDSON; WONG; MACKIE, 1988; DONOHUE et al., 2008; DRIEMEIER; OLIVEIRA; CURVELO, 2016; LANGAN et al., 2014). Além disso, devido à acidez do meio e abrasividade da matéria-prima, a pressurização de reatores de pré-tratamento em escala industrial é um procedimento complexo e custoso e alimentação de biomassa em reator pressurizado não é trivial (DAI; CUI; GRACE, 2012). De fato, as experiências de facilities pioneiras na produção de etanol celulósico, indicam que os reatores são as maiores mudanças para biorrefinarias baseadas em pré-tratamento hidrotérmico (DE LIMA et al., 2016; NOVACANA, 2016).

A desacetilação alcalina tem surgido como alternativa promissora e complementar ao pré-tratamento. A desacetilação remove a maioria dos grupos acetilas da biomassa e pequena fração de lignina, diferindo das condições alcalinas que promovem extensivas deslignificação (CHEN et al., 2012c). Essa etapa foi proposta, inicialmente, anterior e complementar ao pré-tratamento com ácido diluído em palha de milho (CHEN et al., 2012c). Posteriormente, tal processo mostrou-se mais efetivo seguido por refino mecânico, chamado de DRD/DRM (Desacetilação seguido de refino com disco ou refino mecânico) (CHEN et al., 2014, 2016a, 2016b). A rota DRD/DRM supera as maiores limitações do pré-tratamento hidrotérmico, pois pode ser executada em pressão atmosférica, evitando assim a complexidade e custos associados com a pressurização de reatores. Além disso, os açúcares permanecem como polissacarídeos no material sólido desacetilado, o qual é lavado para remover os inibidores de fermentação. Finalmente, a química da lignina nativa é menos perturbada pela condição alcalina branda e por isso a desacetilação oferece perspectivas promissoras para valorização da lignina (NARRON et al., 2016).

Nesse trabalho, foi investigado a resposta da palha e do bagaço de cana-de-açúcar a várias condições alcalinas. Além disso, enquanto a maioria dos estudos enfatiza os processos desenvolvidos para palha de milho (CHEN et al., 2014, 2016a, 2016b), esse trabalho fornece informações úteis sobre como a desacetilação altera a estrutura em multiescala da biomassa a partir da escala molecular para tecidual. Mudanças na composição da biomassa e da

arquitetura molecular são investigadas, fornecendo conhecimento prático e fundamental para biorrefinaria baseado na desacetilação alcalina a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar.

2 Material e métodos

2.1 Biomassa

Bagaço de cana-de-açúcar foi, gentilmente, cedido pela usina Pedra Agroindustrial, localizada na cidade de Serrana, SP, Brasil. O bagaço foi coletado na esteira de bagaço da usina. A palha foi amostrada de fardos obtidos em fazendas locais. Antes do uso da palha no experimento, foi necessário picá-la manualmente, utilizando tesoura para reduzir o tamanho das partículas maiores. Bagaço e palha foram secos em temperatura ambiente e umidade (aproximadamente 10 % de umidade) e posteriormente armazenados.

2.2 Tratamento alcalino

A condição de desacetilação em solução alcalina (0,4 % m/v NaOH; 70 °C; 3 h) teve como referência as condições otimizadas para palha de milho (CHEN et al., 2012c). Além disso, tendo como base essa condição como ponto central, referida daqui em diante (de-Ac), foi feito um delineamento experimental em fatorial com design 2^3 , com um ponto central em três repetições. Os fatores avaliados foram concentração de NaOH (0,1 %; 0,4 % e 0,7 % m/v), temperatura (55 °C; 70 °C e 85 °C) e tempo (1 h; 3 h e 5 h).

Os tratamentos alcalinos foram executados com 25 g de biomassa transferido para reator de 0,5 L, onde 300 mL da solução alcalina foi adicionada, gerando uma razão sólido-líquido (S:L) de 1:12 (g/mL), tal qual empregada para palha de milho (CHEN et al., 2012c). O reator foi aquecido em banho de glicerina durante o tempo de residência da reação e resfriado por 10 minutos em banho com gelo para encerrar a reação. Em seguida, o conteúdo do reator foi vertido sobre malha de polipropileno para filtração. A fração sólida foi lavada exaustivamente com água da torneira para remoção de resíduos solúveis.

As biomassas foram obtidas e processadas como descrito (seção 2.1 Biomassa) e o sólido desacetilado, empregado para obtenção do rendimento de biomassa, composição química, espectros de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR) e obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Alternativamente, a biomassa bruta foi moída por moinho de impacto e cisalhamento (Pulverisette 14, Fritsch, Alemanha) com peneira de controle de 0,2 mm. A biomassa moída

foi então submetida em três condições de tratamento, variando as concentrações alcalinas: 0,1 % NaOH, 55 °C, 1 h; 0,4 % NaOH, 70 °C, 3 h (ponto central); e 0,7 % NaOH, 55 °C, 1 h. Os sólidos gerados nas reações foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), termoporometria calorimétrica (TCDV) e sorção dinâmica de vapor (SDV).

2.3 Determinação da porcentagem de solubilização

Massa seca da amostra foi determinado pesando a amostra úmida e subtraindo o teor de umidade determinado com analisador automático de umidade por infravermelho MA35 (Sartorius GmbH, Alemanha) a partir de alíquota separada. Esse procedimento foi aplicado tanto para a biomassa bruta de entrada e biomassa de saída após tratamento alcalino. A diferença entre biomassa seca de entrada e saída foi expressa como porcentagem de solubilização.

2.4 Composição da biomassa

Conteúdo de cinzas foi determinado gravimetricamente por calcinação da biomassa em mufla (SLUITER et al., 2008). Conteúdo de extrativos em bagaço e palha bruta foi determinado por extração em ciclohexano-etanol 1:1 (v/v) por 24 horas, usando um sistema de extração Soxhlet. Amostras extraídas ou após reações alcalinas foram submetidas em duas etapas de hidrólise ácida analítica seguido por filtração. O filtrado foi utilizado para determinação da concentração de açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos (furfural e hidroximetilfurfural), usando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Açúcares (glicose, celobiose e xilose) e ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico e levulínico) foram determinados por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. Para os produtos de degradação, as concentrações de hidroximetilfurfural e furfural foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4,8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm).

Lignina solúvel, no filtrado, foi determinada com as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (LAMBDA 25, PerkinElmer, Estados Unidos) a 280 nm com o hidrolisado ajustado anteriormente para pH 12. Lignina insolúvel foi determinada

gravimetricamente como resíduo sólido insolúvel obtido após hidrólise com subtração do conteúdo de cinzas determinado por calcinação. A lignina total é a soma da fração de lignina insolúvel e solúvel. As concentrações de glicose, celobiose, hidroximetilfurfural, ácido fórmico e levulínico foram convertidos para conteúdo de glucana. Similarmente, as concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural foram usados para determinar o conteúdo de hemicelulose (SLUITER et al., 2016).

2.5 Espectroscopia por infravermelho

Amostra bruta e após o tratamento alcalino foram secas em condição ambiente e moídas em moinho de impacto e cisalhamento (Pulverisette 14, Fritsch, Alemanha) com peneira de controle 0,08 mm. Posteriormente, as partículas resultante foram analisadas em triplicatas por espectrômetro FTIR (PerkinElmer, Estados Unidos) com acessório de refletância total atenuada universal (ATR), empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe) recoberto com filme de diamante. Foram adquiridos espectros na faixa de 600-4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , intervalos de registro de 1 cm^{-1} e 16 varreduras por espectro.

2.6 Difração de raios-X

As amostras para difração de raios-X foram secas ao ar e acondicionadas em tubos capilares especiais para DRX ($\varnothing = 2$ mm, Charles Supper Company). Radiação Cu-K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) foi gerado por Rigaku ultraX-18HF gerador de anodo rotacional e com monocromador óptico VariMax. Para análise, raios X incide ortogonalmente sobre os tubos de vidro com amostra e posteriormente os padrões de difração são detectados em placa detectora de imagens mar345 (Marresearch GmbH, Germany) com 150 μm de pixel posicionado a 120 mm após os tubos da amostra. O tempo de exposição da amostra foi de 6 minutos com rotação de 360° do tubo capilar ao redor do eixo durante a análise. Os padrões de difração bidimensionais foram calibrados, corrigidos e analisados pelo modelo CRAFS (OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013), usando as intensidades dos picos descritos anteriormente (DRIEMEIER et al., 2015). O CRAFS é um modelo paramétrico que ajusta os padrões de difração calculados aos experimentos. Dentre os parâmetros determinados, a largura do cristal de celulose em L_{200} é especialmente importante, pois é precisamente determinada a partir do pico de difração proeminente (200). Essencialmente, a análise CRAFS em L_{200} aplica à equação de Scherrer com correção para ampliação do pico instrumental (OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013).

2.7 Sorção dinâmica de vapor

SDV foi determinado a 50 °C pelo analisador de sorção (Q5000 SA, TA Instruments, Estados Unidos) em cadinho de quartzo metalizado. Amostras úmidas foram submetidas em etapas sequenciais de decréscimo (dessorção) e aumento (sorção) de umidade relativa. A massa de água registrada no fim de cada etapa de umidade relativa foi usada para construir a curva de isoterma de sorção e dessorção (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012), os quais foram ajustados pelo modelo “Hailwood–Horrobin sorption”(HH)(HAILWOOD; HORROBIN, 1946; SKAAR, 1988). Três parâmetros foram avaliados pelo modelo de isoterma HH: m_0 , monocama de hidratação, ΔG_h , energia livre de mudança da monocama de hidratação e ΔG_d , energia livre de dissolução da monocamada de água.

2.8 Termoporometria colorimétrica

A porosidade das amostras foi determinada automaticamente por Calorímetro Diferencial de Varredura – TCDV (DSC Q200, TA Instruments, Estados Unidos), seguindo os procedimentos laboratoriais e análise de dados descritos (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012; MENDES; LING; DRIEMEIER, 2016). Para análise por TCDV, amostra úmida foi submetida primeiramente ao congelamento a -70 °C. Por controlar a rampa de temperatura, TCDV detecta a água confinada congelável (FBW, do inglês, freezing bound water) nos poros, mensurando o deslocamento da temperatura de transição sólido-líquido abaixo de 0 °C. A partir da redução da temperatura de fusão ΔT , o diâmetro de poro, d , é calculado por $d = -2 K_c / \Delta T$ com $K_c = 19,8$ nm. Além disso, o sinal calorimétrico de derretimento do gelo em cada etapa de aquecimento é convertido em massa de água que é associada a um diâmetro de poro. O resultado é expresso como distribuição cumulativa de água confinada, FBW (g massa de água/g biomassa seca) em função de um diâmetro equivalente de poros (1-200 nm).

2.9 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras úmidas foram congeladas e enviadas do LNBR para o NREL (do inglês, National Renewable Energy Laboratory) para estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET). Quanto a análise por MEV, partículas hidratadas foram seccionadas e liofilizadas. Os cortes foram posicionados em fita de carbono com revestimento duplo, montadas sobre alumínio e revestidos por aspersão com 5 nm de irídio.

Imagem por MEV foi realizada utilizando um FEI Quanta 400 FEG com uma voltagem de aceleração de 10 keV.

2.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras úmidas foram preparadas, primeiramente, por ultramicrotomografia, usando desidratação química assistida por micro-ondas e procedimentos de infiltração com resina. As amostras foram desidratadas em 4 etapas com aumento da concentração de etanol. Posteriormente, os procedimentos com troca de resina assistida por micro-ondas foram realizados em 4 etapas com intervalo de infiltração de 1 minuto em micro-ondas. Após os procedimentos em micro-ondas, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente em repouso (overnight) em 100 % de resina antes da polimerização. As amostras foram então transferidas para cápsulas de fundo plano e polimerizadas a 60 °C sob um ambiente com nitrogênio. Amostras imersas foram cortadas a 100 nm com lâmina de diamante (Diatome, Hatfield, PA) sobre ultramicrotomo (Leica, Wetzlar, Germany). Os cortes foram coletados em grades de fenda de cobre revestidas com Formvar 0,5 % (SPI Supplies, West Chester, PA). As grades foram, posteriormente, coradas por 30 s com 1 % de KMnO_4 . Imagens foram capturadas em 4 mega-pixel Gatan UltraScan 1000 câmera (Gatan, Pleasanton, CA) sobre FEI Tecnai G2 20 Twin 200 kV LaB6 TEM (FEI, Hillsboro, OR).

3 Resultados e discussões

3.1 Solubilização da biomassa promovida pelo tratamento alcalino

A condição de desacetilação (de-Ac) solubilizou 12,3 % no bagaço e 26,3 % na palha de cana-de-açúcar (Tabela 2.1), enquanto que em palha de milho, a solubilização relatada foi de aproximadamente 20 % (CHEN et al., 2012c). A maior susceptibilidade da palha de cana-de-açúcar em relação ao bagaço é observada em todas as condições alcalinas avaliadas (Tabela 2.1). A importância relativa dos vários fatores (% NaOH, temperatura e tempo) pode ser observada na Tabela 2.1, a qual classifica as condições alcalinas em ordem crescente de solubilização, exceto em duas condições com o bagaço, onde a diferença (6,7 e 6,2 %) não é considerada significativa. Os três fatores experimentais avaliados aumentaram a solubilização e, para as condições avaliadas, sua importância relativa é classificada, como % NaOH > temperatura > tempo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Condições de tratamento escolhido por desenho experimental fatorial 2³ e percentual de solubilização determinado gravimetricamente

Tratamento	Condições (% NaOH; °C; horas)	Bagaço solubilização (%)	Palha solubilização (%)
branda	^b 0,1; 55; 1	6,7	16,8
	0,1; 55; 5	6,2	17,6
	0,1; 85; 1	8,8	18,4
	0,1; 85; 5	10,9	20,0
de-Ac	^{a,b} 0,4; 70; 3	12,3±0,6	26,3±0,2
	^b 0,7; 55; 1	14,7	30,0
	0,7; 55; 5	17,5	34,6
severa	0,7; 85; 1	21,7	37,9
	0,7; 85; 5	24,2	41,3

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: ^aDesvio padrão e porcentagem de solubilização em três repetições experimentais são mostrados apenas para a condição ponto central (de-Ac: 0,4 % NaOH, 70 °C, 3 h). Condições adicionais foram testadas, como NaOH (0,1 e 0,7 %), temperatura (55 e 85 °C) e tempo (1 e 5 h); ^bCondições usadas para estudos por difração de raios-X, sorção dinâmica de vapor e termoporometria. O fator dominante foi concentração de NaOH (%).

3.2 Identificação dos componentes solubilizados

FTIR foi utilizado para obtenção de informações químicas qualitativas dos componentes solubilizados. Em comparação com o bagaço e a palha bruta, as amostras desacetiladas no ponto central mostraram uma importante redução das absorbâncias em 1240 cm⁻¹ e 1730 cm⁻¹ (Figura 2.1).

Figura 2.1- Espectros infravermelhos do bagaço e da palha de cana-de-açúcar no material bruto e desacetilado na condição ponto central (de-Ac)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: A linha de base foi subtraída e a absorbância normalizada.

Essas bandas são consistentes com ligações ésteres C-O e C=O na parede celular, como grupos acetilas (SENE et al., 1994). As reduções de tais absorbâncias são, portanto, consistentes com a quebra de ligações ésteres, como principal reação, promovida pelo tratamento alcalino. Além disso, foram observados menores reduções das absorbâncias em outras regiões espectrais, incluindo a banda 1510 cm^{-1} associada a vibração do anel aromático, o que seria consistente com a remoção parcial de lignina. Outra observação importante, foi que a palha bruta apresentou uma maior absorbância em uma região espectral ampla entre $1300\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, onde os modos de vibração, tais como flexão de C-H e estiramento de C=C são esperados (SENE et al., 1994). A extração alcalina reduz a absorbância nesta faixa e o espectro resultante da palha desacetilada é bastante semelhante ao bagaço desacetilado. Esse resultado revela que a palha bruta tem uma vasta gama de componentes químicos que são solubilizados sob as condições de desacetilação, confirmando os dados de solubilização da biomassa (Tabela 2.1).

Informação química mais específica e detalhada pode ser obtida por análise de composição da biomassa. A tabela 2.2 mostra que a condição de desacetilação ponto central remove os extrativos do bagaço, a maior parte dos grupos acetilas ($2,76\% \rightarrow 0,27\%$) e uma pequena fração de lignina ($23,2\% \rightarrow 18,7\%$), resultados similares foram observados com palha de milho (CHEN et al., 2012b, 2016b). Por outro lado, os teores de glucana, xilana,

arabinana e cinzas totais no bagaço não foram alterados, como porcentagem de matéria seca bruta (Tabela 2.2). Entretanto, em outros estudos, o conteúdo de cinzas totais foi reduzido após a desacetilação (CASTRO et al., 2016; SHEKIRO III et al., 2016), sugerindo uma relação com o tipo de minerais presente na biomassa. A palha de cana-de-açúcar perdeu mais açúcares durante etapa de desacetilação em relação ao bagaço. Além da remoção de extrativos, maioria dos grupos acetilas (1,58 % $\rightarrow$ 0,12 %) e uma fração de lignina (25,4 % $\rightarrow$ 17,1 %), a palha apresentou perda significativa de glucana (35,4 % $\rightarrow$ 28,4 %) e xilana (21,9 % $\rightarrow$ 17,0 %). Somente o conteúdo de cinzas totais e arabinana permaneceram inalterados pela desacetilação com a palha. Os espectros de FTIR e as análises de composição demonstram uma concordância geral quanto à presença de uma gama de componentes químicos mais suscetíveis à extração alcalina na palha de cana-de-açúcar. Informações mais detalhadas quanto à caracterização química da palha e do bagaço de cana em todas as condições alcalinas estudadas podem ser consultadas nos apêndices A e B.

Tabela 2.2 - Composição química (% , m/m) do bagaço e da palha de cana-de-açúcar bruta e desacetilada (de-Ac) dado como porcentagem de matéria seca^a

Biomassa	Condição	Glucana	Xilana	Arabinana	Acetil	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	Balanço de massa
Bagaço	bruto	39,5 ± 0,5	22,9 ± 0,8	2,0 ± 0,1	2,76 ± 0,09	28,5 ± 1,1	23,2 ± 1,3	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	94,5
	de-Ac	45,2 ± 0,4	25,3 ± 0,3	2,8 ± 0,1	0,30 ± 0,08	29,9 ± 0,5	21,4 ± 0,3	1,2 ± 0,3	-	97,7
	^a de-Ac (% bruto)	39,6 ± 0,4	22,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	0,27 ± 0,08	26,2 ± 0,5	18,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3		
Palha	bruto	35,4 ± 0,6	21,9 ± 0,4	2,5 ± 0,1	1,58 ± 0,02	26,2 ± 0,5	25,4 ± 1,1	2,9 ± 0,2	5,3 ± 0,3	95,2
	de-Ac	38,5 ± 0,5	23,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0,16 ± 0,01	27,7 ± 0,3	23,2 ± 0,3	3,4 ± 0,1	-	92,8
	^a de-Ac (% bruto)	28,4 ± 0,5	17,0 ± 0,2	2,2 ± 0,1	0,12 ± 0,01	20,4 ± 0,3	17,1 ± 0,3	2,5 ± 0,1		

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: ^a Os sólidos desacetilados são, também, dados como porcentagem de matéria seca bruta, os quais foram corrigidos sobre a remoção de 12,3 % e 26,3 % do bagaço e da palha, respectivamente, no processo de desacetilação.

Figura 2.2 - Composição química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar após várias condições de extração alcalina com NaOH

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: O gráfico mostra a composição como porcentagem de biomassa seca tratada (A) e bruta (B) em função da porcentagem de biomassa solubilizada pela extração com NaOH (Consultar Tabela 2.1). Os dados da biomassa bruta foram corrigidos pelo rendimento da reação para visualização real da perda dos componentes.

Conhecimento adicional é obtido avaliando a composição da biomassa em todas as condições de tratamento alcalino aplicado no experimento (Listado na Tabela 2.1). Na Figura 2.2, os conteúdos são dados como porcentagem de matéria seca tratada (Figura 2.2 A), bem como a porcentagem de matéria seca bruta (Figura 2.2 B), que informa diretamente a remoção dos componentes. Pode-se identificar tendências de preservação ou perda de componentes em função da solubilização. Dessa forma, tanto para o bagaço quanto para a palha, podemos inferir que o conteúdo de cinzas é preservado sob tratamento alcalino, enquanto que a lignina é progressivamente removida à medida que aumenta a severidade do tratamento. A maior parte dos grupos acetilas é removido após tratamento com NaOH a 0,4 % ou 0,7 %, enquanto que em 0,1 % de NaOH remove-se uma fração menor de grupos acetilas, evidenciando que [NaOH] tem um papel chave na extensão da reação de desacetilação. Arabinana no bagaço é preservada em todas as severidades do tratamento, enquanto que a arabinana na palha é perdida em severidades mais elevadas. Para o bagaço e a palha, a xilana é progressivamente removido à medida que a severidade aumenta, sendo a solubilização mais expressiva na palha do que no bagaço. A glucana do bagaço é preservada em todas as severidades do tratamento. Por outro lado, parte da glucana da palha é perdida sob as condições de tratamento mais brando, mas não é observado perda adicional de glucana em condições alcalinas mais severas. Esse último resultado evidencia algum tipo de glucana de fácil extração presente na palha de cana-de-açúcar.

3.3 Ausência de cocrystalização da celulose

A cocrystalização da celulose tem sido observado em vários pré-tratamentos de biomassa que usam alta temperatura, tais como hidrotérmico (DRIEMEIER et al., 2015; LANGAN et al., 2014) e polpação química de madeira (LEPPÄNEN et al., 2009). Cocrystalização da celulose é observada, como aumento da largura média dos cristais de celulose. Simulações de dinâmica molecular (LANGAN et al., 2014) e cálculos de termodinâmica (SILVEIRA et al., 2016) tem indicado que a cocrystalização da celulose resulta a partir da fusão lateral de cristais de celulose adjacentes. A maneira mais comum de observar a cocrystalização da celulose é através da intensidade dos picos de difração de raios-X associados com as dimensões laterais L dos cristais de celulose, especialmente o mais destacado é o pico de difração no 200 (DRIEMEIER et al., 2015; LEPPÄNEN et al., 2009).

Figura 2.3 - Difração de raios X da biomassa bruta e após tratamento com NaOH

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (a) - Difratoograma do bagaço bruto e após desacetilação na condição ponto central. (b) - Determinação da largura dos cristais de celulose em função da solubilização após vários tratamentos alcalino do bagaço e da palha. Os dados do bagaço e da palha do experimento no gráfico (b) são comparados com os dados do tratamento hidrotérmico do bagaço (160-190 °C). Os dados de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço foram cedidos por Driemeier et al. (2015).

Comparação dos difratogramas do bagaço bruto e desacetilado, mostram que tal intensidade está presente, mas apenas em pequena extensão (Figura 2.3 a). A análise pelo modelo CRASF revelou pouco ganho na largura dos cristais (L_{200}) tanto para o bagaço quanto para a palha submetidos às condições de desacetilação (0,1; 0,4; 0,7 %, NaOH)(Figura 2.3 b). O ganho observado em L_{200} (acima de 0,3 nm) foi maior que a condição experimental precisamente calculada ($\sim 0,1$ nm). Embora esta observação possa ser uma indicação qualitativa da cocrystalização da celulose, a magnitude da alteração é pequena não sendo significativo. Estudos anteriores estimam que uma evidência robusta de cocrystalização da celulose necessitaria de ganhos relativos em L_{200} superior a 10 % (DRIEMEIER et al., 2015). Tais ganhos são observados após tratamento hidrotérmico, mas não após as condições de extração alcalina nesse estudo (2,9-3,2 nm). Assim, concluí-se que o tratamento alcalino investigado não causa cocrystalização significativa da celulose.

3.4 Alteração na camada de hidratação

Figura 2.4 - Conteúdo de umidade do bagaço (a) e da palha (b) bruta e após tratamento alcalino no ponto central

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (c) Diferença no conteúdo de umidade entre bagaço e palha desacetilada no ponto central. Parâmetros obtidos pelo modelo HH da análise das isoterma de sorção e de dessorção em bagaço e palha bruta e após tratamento de desacetilação (0,1 %, 55 °C, 1h; 0,4 %, 70 °C, 3 h e 0,7 %, 55 °C, 1 h, NaOH): (d) m_0 , monocama de hidratação; (e) ΔG_h , energia livre de mudança da monocama de hidratação e (f) ΔG_d , energia livre de dissolução da monocamada de água.

Bagaço (Figura 2.4 a) e palha (Figura 2.4 b) de cana-de-açúcar bruta e desacetilada mostraram conteúdo de umidade de isoterma de sorção similares, os quais podem ser diferenciados apenas comparando o conteúdo de úmida entre biomassas após desacetilação (Figura 2.4 c). No entanto, em uma inspeção mais detalhada, as isotermas de dessorção e sorção equipadas com modelo de sorção Hailwood-Horrobin (HAILWOOD; HORROBIN, 1946; SKAAR, 1988) e os parâmetros obtidos m_0 , ΔG_h e ΔG_d revelam tendências consistentes em função da severidade alcalina (Figura 2.4 d-f). A monocamada de hidratação m_0 se tornou bastante estável em função das condições alcalinas aplicadas (Figura 2.4 d), o

que pode ser explicado pela estabilidade da largura dos cristais de celulose L_{200} (Figura 2.3 b)(DRIEMEIER; BRAGATTO, 2013). A energia livre de hidratação da monocamada (ΔG_h) possui valor negativo (-200 para -250 J/g) relacionado com a hidrofiliicidade na superfície da biomassa (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012; SKAAR, 1988). ΔG_h decresce à medida que aumenta a severidade alcalina (Figura 2.4 e), consistente com a remoção de grupos hidrofóbicos, como acetilas; tornando a biomassa com superfície mais hidrofílica. A energia livre da água dissolvida, ΔG_d tem valor positivo ($40-49$ J/g), refletindo a resistência necessária da biomassa ao inchamento associada a absorção de água (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012). ΔG_d , também, decresce com aumento da severidade alcalina. Especula-se que a absorção de água é facilitada pelos ganhos em porosidade em nanoescala, o que pode ser confirmado posteriormente pela análise por termoporometria. A tendência é quebrada somente com a palha bruta (Figura 2.4 e, f), que é um material completamente diferente quando se considera a diversidade de compostos presente, como evidenciado pelo FTIR (Figura 2.1) e análise de composição (Tabela 2.1 e Figura 2.2).

3.5 Abertura de poros em nanoescala

Figura 2.5 - Perfis de água confinada congelável (FBW) antes e após desacetilação (de-Ac) do bagaço (a) e da palha (b)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (c) FBW de bagaço de cana submetido ao tratamento hidrotérmico ($160-190$ °C) alcançando várias porcentagens de solubilização. A seta laranja (Figura 2.5 c) indica ganho de poros FBW (<4 nm) atribuído à água alojada em agregados de lignina, o qual não é registrado após desacetilação alcalina (2.5 a, b). (d) Ganho de poros FBW entre 10-200 nm após desacetilação da palha (círculo vermelho) e do bagaço (quadrado azul) em comparação ao tratamento hidrotérmico do bagaço (triângulo preto). Os dados do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço foram fornecidos por Driemeier et al. (2015).

O papel primário do pré-tratamento é abrir poros em nanoescala na estrutura da biomassa, os quais aumentam a acessibilidade à parede celular pelas enzimas (ARANTES; SADDLER, 2011; DING et al., 2012b). O resultado por TCDV registra que o tratamento de desacetilação aumentou a porosidade em bagaço (Figura 2.5 a) e palha (Figura 2.5 b) com

maior ganho relacionado ao aumento da severidade do tratamento (Figura 2.5 d). Notavelmente, são observados ganhos de poros FBW com diâmetro de 10 nm ou superior. Analisando poros FBW entre 10-200 nm (Figura 2.5 d), observa-se pouco ganho com baixa taxa de solubilização (tratamento 0,1 % NaOH), indicando certo limite de severidade no tratamento para obter ganho de porosidade em nanoescala. A condição ótima de desacetilação está além desse limite. Comparando a porcentagem de solubilização e ganho de poros no tratamento alcalino e hidrotérmico, o maior ganho de poros entre 10-200 nm é observado apenas após tratamento alcalino. Tais resultados evidenciam que o tratamento alcalino pode ser mais seletivo que o hidrotérmico na abertura de poros em nanoescala.

3.6 Ausência de agregados de lignina

Outro fenômeno coesivo em nanoescala induzido pela condição hidrotérmica é a formação de agregados de lignina (DONALDSON; WONG; MACKIE, 1988; DONOHUE et al., 2008; LANGAN et al., 2014). Tem sido relatado que tais agregados contribuem para o sinal termoporométrico (FBW) a baixo de ~4 nm (Figura 2.5 c), o qual foi atribuído à água associada a superfície irregular de agregados de lignina (DRIEMEIER; OLIVEIRA; CURVELO, 2016). Esse sinal termoporométrico não está presente nas condições alcalinas (Figura 2.5 a, b), indicando ausência de agregados de lignina após tratamento alcalino.

3.7 Visualização de tecidos e da parede celular

Modificações estruturais que ocorreram na biomassa após tratamento alcalino foram investigados em escala tecidual e ultraestrutura da parede celular por MEV e MET. Micrografias obtidas por MEV a partir de partículas seccionadas estão presentes na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tecido vascular do bagaço e da palha antes e após desacetilação (de-Ac)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Bagaço e palha antes do tratamento alcalino mostram parede celular intacta (A e C). Entretanto, após tratamento de desacetilação (B e D), os sinais de enfraquecimento mecânico, assim como algumas regiões com severa desconstrução da parede celular são observadas. Círculos mostram regiões com desconstrução mais severa e as setas dentro do círculo indicam regiões com delaminação da parede celular em palha e bagaço após tratamento (B e D). Retângulo branco denota regiões com desconstrução branda (B e D).

As imagens por MEV das amostras desacetiladas evidenciaram uma desconstrução heterogênea da parede celular. Em bagaço e palha desacetilados, algumas regiões estão intactas, exibindo leve desconstrução (exemplo sendo mostrado no retângulo branco no lado direito da Figura 2.6). Entretanto, a parede celular em outras regiões parece severamente desconstruída (exemplo sendo mostrado como círculo branco no lado direito da Figura 2.6). Interessantemente, os exemplos da desconstrução branda e severa na parede celular são observados na parede celular secundária.

Figura 2.7 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da parede celular secundária do tecido vascular do bagaço antes (A) e após tratamento de desacetilação (B e C)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Comparado ao material bruto, imagens da parede celular após desacetilação mostraram diferenças marcantes quanto as tonalidades mais escuras e com maior contraste em resposta ao corante químico usado, mesmo nos casos de desconstrução branda. Entretanto, algumas regiões apresentam desconstrução mais severa, principalmente na forma de delaminação da camada da parede celular (C).

As micrografias obtidas por MET a partir do tecido vascular do bagaço bruto e desacetilado (Figura 2.7) fornecem informações adicionais sobre o impacto da desacetilação alcalina sobre a ultraestrutura da parede celular. Pode-se notar que mesmo regiões onde a deformação estrutural foi leve (Figura 2.7 B), diferenças notáveis a partir do contraste obtido pela coloração com KMnO_4 foi observada em comparação com a parede celular do bagaço bruto, o qual apresentou uma parede celular mais escura com menor contraste entre as várias camadas, indicando modificação química da parede celular após desacetilação. Tais observações estão de acordo com FTIR e análise composicional, os quais indicaram a existência de classes de compostos químicos presente na parede celular que são afetados pela desacetilação. Além disso, algumas regiões foram extensivamente desconstruídas (Figura 2.7 C).

Quanto a desconstrução heterogênea da parede celular observada por MEV e MET, especula-se que tais processos ocorram em regiões enfraquecidas mecanicamente, tornando essas regiões mais suscetível ao tratamento químico (CIESIELSKI et al., 2014) e/ou limitações relacionadas ao transporte intrapartícula do NaOH , restringindo o acesso do componente químico a certas regiões da biomassa durante desacetilação. Além disso, imagens obtidas do bagaço e da palha desacetilada mostram evidências de enfraquecimento mecânico em comparação com a amostra bruta (Figura 2.6 B e D).

A superfície da parede celular na biomassa desacetilada, geralmente, mostra-se mais deformada em comparação ao material bruto, o que sugere um enfraquecimento mecânico

proporcionado pela desacetilação. Tais observações são consistentes com trabalhos anteriores, relatando que a desacetilação alcalina reduz o custo energético necessário para reduzir partícula por refino mecânico (CHEN et al., 2016b). Além disso, algumas regiões apresentaram severa desconstrução, principalmente, na forma de delaminação de camadas da parede celular. Delaminação e afrouxamento geral da parede celular em tecidos de amostras desacetiladas poderão facilitar o acesso de enzimas aos carboidratos durante sacarificação (ARANTES; SADDLER, 2011; DING et al., 2012b).

3.8 Diferenças entre bagaço e palha

As diferenças entre bagaço e palha de cana-de-açúcar podem ser explicadas em escala tecidual e por processos históricos. Em estudos anteriores, a palha tem sido mais suscetível (menos recalcitrante) que o bagaço em algumas condições testadas, incluindo tratamento hidrotérmico e alcalino, assim como na hidrólise enzimática (CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016; CARVALHO et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). Comportamento similar em escala tecidual tem sido observado com outras gramíneas (ZENG et al., 2012). Do ponto de vista histórico, o bagaço de cana-de-açúcar é resultante do processo de moagem da cana para extração do caldo a 70 °C (DIAS et al., 2015). Portanto, o bagaço bruto sempre passa por processo de extração em água quente, não sendo o caso da palha. Para biorrefinaria baseada na desacetilação alcalina, a remoção de 20 % de glucana e xilana a partir da palha bruta (Tabela 2.2) merece atenção especial. Na rota DRD/DRM (CHEN et al., 2014, 2016b, 2016a), para valorização dos açúcares (ex., fermentação a etanol), usa-se os açúcares preservado como polissacarídeos no material sólido desacetilado. Portanto, a maior solubilização de glucana e de xilana a partir da palha durante desacetilação alcalina necessita de etapa adicional para valorização, aumentando os custos e complexidade do processo. Assim, o uso da palha, como matéria prima para biorrefinaria baseada em desacetilação alcalina, nessas condições, é desvantajosa.

3.9 Relação entre alterações químicas e morfológicas

Mudanças químicas e morfológicas ocorreram durante o tratamento alcalino da biomassa, tornando necessário compreender a relação entre tais modificações. Estudos sobre a cocristalização da celulose indica que o fenômeno depende da remoção de lignina e da hemicelulose (possibilita contato direto entre cristais de celulose adjacentes) e alta temperatura (desidratação de regiões intercristalitos) (DRIEMEIER et al., 2015; LANGAN

et al., 2014; SUN et al., 2014). Na desacetilação alcalina, são moderadas as remoções de tais componentes e a temperatura aplicada (55-85 °C). Nesse sentido, o fenômeno da cocrystalização da celulose não foi observado após desacetilação (Figura 2.3).

Em relação as mudanças na hidratação, o aumento da hidrofiliidade (decréscimo de ΔG_h) na superfície de interação com a água está relacionado com as remoções específicas dos componentes hidrofóbicos na biomassa, principalmente extrativos, lignina e grupos acetilas (Tabela 2.2; Figura 2.2). Os grupos acetilas na hemicelulose ajudam na integridade estrutural da parede celular por criar contato hidrofóbico com lignina, ligada de forma não covalente a hemicelulose (PAWAR et al., 2013). Portanto, por eliminar esse tipo de ligação ou interação, a desacetilação reduz a integridade estrutural da parede celular. Além disso, ácido *p*-cumárico e ferúlico possuem ligações éster com hemicelulose e ocasionalmente éster e éter com lignina (DE OLIVEIRA et al., 2015; DEL RÍO et al., 2015a; JU et al., 2011; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; XU et al., 2005b). As ligações éster são suscetíveis as condições alcalinas e, assim, a quebra dessas ligações entre ácido ferúlico e *p*-cumárico com hemicelulose e lignina podem ter contribuído para o enfraquecimento mecânico, delaminação da parede celular e abertura de poros em nanoescala observados em palha e bagaço após desacetilação (Figura 2.5-2.7).

3.10 Desacetilação alcalina comparado ao pré-tratamento hidrotérmico

Algumas plantas pioneiras produzindo etanol celulósico empregam pré-tratamento hidrotérmico em meio ácido e a desacetilação alcalina fornece um pré-tratamento químico, como alternativa, sendo necessário comparar as duas observações. Tratamento hidrotérmico hidroliza e solubiliza preferencialmente a hemicelulose. Entretanto, extrativos, fragmentos de lignina e grupos acetilas são solubilizados juntos e furfural é formado, especialmente quando um catalisador ácido é adicionado. Portanto, os açúcares solubilizados estão misturados com várias classes de compostos tóxicos para fermentação (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Na rota de desacetilação alcalina, os açúcares permanecem na fração sólida e alguns inibidores são removidos, tornando um processo vantajoso. Por outro lado, o licor alcalino resultante dessa etapa necessita de estratégias para recuperação do componente alcalino e valorização dos compostos orgânicos presente dentro do contexto biorrefinaria.

Quanto a indução do fenômeno de coesão em nanoescala; no tratamento hidrotérmico, a cocrystalização da celulose (DRIEMEIER et al., 2015; LANGAN et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016) e a agregação de lignina (DONALDSON; WONG;

MACKIE, 1988; DRIEMEIER; OLIVEIRA; CURVELO, 2016; LANGAN et al., 2014) são observados e relacionados em parte com a alta temperatura. Entretanto, os fenômenos coesivos são contrários ao objetivo primário do pré-tratamento, que é a abertura da estrutura da biomassa (ARANTES; SADDLER, 2011; CIESIELSKI et al., 2014; DING et al., 2012b). Portanto, a ausência da cocrystalização da celulose (Figura 2.3) e da agregação de lignina (Figura 2.5) podem ser consideradas características vantajosas para desacetilação alcalina comparado ao pré-tratamento hidrotérmico.

Quanto a abertura da estrutura da biomassa; num primeiro momento, a delaminação da parede celular após desacetilação alcalina (Figura 2.6 e 2.7) não é tão diferente em relação ao produzido pelo tratamento hidrotérmico, como explosão a vapor (INOUE et al., 2015). Entretanto, tal comparação é injusta, pois explosão a vapor é executada em alta severidade e a despressurização do reator aplica ação mecânica sobre a biomassa, a qual ajuda na desconstrução. Para tornar justa a comparação, os dados de termoporometria da Figura 2.5 d compara o tratamento hidrotérmico com a desacetilação alcalina sem qualquer ação de força mecânica aplicado ao pré-tratamento da biomassa. Além disso, variações na severidade são padronizadas através do eixo X comum (% de solubilização na Figura 2.5 d). Tal comparação ajustada sugere que a desacetilação alcalina pode ser mais efetivo que o tratamento hidrotérmico brando na abertura de poros em nanoescala na biomassa. Claramente, esse é um ponto favorável para a desacetilação alcalina.

4 Conclusões

Em resumo, foi realizado múltiplas caracterizações para investigar o impacto da desacetilação alcalina sobre bagaço e palha de cana-de-açúcar. As investigações apontam que o processo de desacetilação quebram primariamente ligações éster, liberam grupos acetilas e quebram ligações covalentes entre lignina e hemicelulose. Isso facilita uma introdução substancial da porosidade em nanoescala, enquanto que as condições brandas, como baixa temperatura evitam a cocrystalização da celulose e a agregação de lignina que são freqüentemente encontrados em pré-tratamentos hidrotérmicos. Evidência geral de redução na integridade mecânica do tecido, também, foi observado. Além disso, análise composicional revela que o tratamento alcalino solubilizou a maioria dos grupos acetilas e pouca lignina no bagaço, enquanto que na palha a solubilização de xilana e glucana é observado adicionalmente nas mesmas condições. Esse contraste entre bagaço e palha deve ser considerado em um projeto de biorrefinaria. Finalmente, a combinação dos atributos modificações químicas e reduzida integridade mecânica pela desacetilação alcalina sugere

que este pré-tratamento é uma alternativa promissora para aplicações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar dentro do contexto biorrefinaria.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro proporcionado pela CAPES, CNPq (455549/2014-1) e FAPESP (15/50590-4). A microscopia eletrônica foi suportada pelo Centro de Conversão Catalítica Direta para Biocombustíveis (C3Bio), um centro de pesquisas em energias fundado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (DE-SC0000997).

Referências

- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 3, p. 1–16, 2011.
- CARVALHO, D. M.; QUEIROZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932–941, 2016.
- CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.
- CASTRO, R. C. A. et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 1, p. 1–9, 2016.
- CHEN, X. et al. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–14, 2012a.
- CHEN, X. et al. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 70–76, 2012b.
- CHEN, X. et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–11, 2014.
- CHEN, X. et al. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g/L) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (>10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or con. **Energy & Environmental Science**, v. 9, p. 1237–1245, 2016a.
- CHEN, X. et al. Improving sugar yields and reducing enzyme loadings in the deacetylation and mechanical refining (DMR) process through multistage disk and szego refining and

corresponding techno-economic analysis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 1, p. 324–333, 2016b.

CIESIELSKI, P. N. et al. Effect of mechanical disruption on the effectiveness of three reactors used for dilute acid pretreatment of corn stover Part 2: morphological and structural substrate analysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 47, p. 1–11, 2014.

CORTEZ, L. A. B. **Sugarcane bioethanol — R&D for productivity and sustainability**. 1st ed. [s.l.]: Editora Edgard Blücher, 2014.

DAI, J.; CUI, H.; GRACE, J. R. Biomass feeding for thermochemical reactors. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 5, p. 716–736, out. 2012.

DE LIMA, D. R. et al. Pretreatment Processes for Cellulosic Ethanol Production: Processes Integration and Modeling for the Utilization of Lignocellulosics Such as Sugarcane Straw. In: SOCCOL, C. et al. (Eds.). **Green Fuels Technology**. [s.l.]: Springer, Cham, 2016. p. 107–131.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1224–1232, 2015.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DIAS, M. O. DE S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DING, S.-Y. et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? **Science**, v. 338, n. 6110, p. 1055–1060, 2012.

DONALDSON, L. A.; WONG, K. K. Y.; MACKIE, K. L. Ultrastructure of steam-exploded wood. **Wood Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 103–114, 1988.

DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913–925, 2008.

DRIEMEIER, C. et al. Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v. 22, p. 2183–2195, 2015.

DRIEMEIER, C.; BRAGATTO, J. Crystallite width determines monolayer hydration across a wide spectrum of celluloses isolated from plants. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 415–421, 2013.

DRIEMEIER, C.; MENDES, F. M.; OLIVEIRA, M. M. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. **Cellulose**, v. 19, p. 1051–1063, 2012.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S. Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 114–117, 2016.

HAILWOOD, A. J.; HORROBIN, S. Absorption of water by polymers: Analysis in terms

of a simple model. **Transactions of the Faraday Society**, v. 42, p. 84–92, 1946.

HOOGWIK, M. et al. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 2, p. 119–133, 2003.

INOUE, H. et al. Multiscale deconstruction of molecular architecture in corn stover. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2015.

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

JU, Y. H. et al. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 591–599, 2011.

JUNQUEIRA, T. L. et al. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 50, p. 1–12, 2017.

LANGAN, P. et al. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chem.**, v. 16, n. 1, p. 63–68, 2014.

LEPPÄNEN, K. et al. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by X-ray scattering. **Cellulose**, v. 16, n. 6, p. 999–1015, 1 dez. 2009.

LYND, L. R. et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202–211, 2017.

MENANDRO, L. M. S. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 488–504, 2017.

MENDES, F. M.; LING, L. Y.; DRIEMEIER, C. **Laboratory and Data Analysis Procedures for Determination of Biomass Nanoscale Porosity Employing Calorimetric Thermoporometry**. Campinas, SP: Brazilian Center for Research in Energy and Materials, 2016.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MUSSATTO, S.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

NARRON, R. H. et al. Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 39–46, 2016.

NOVACANA. Exclusivo : Custo de produção estimado do etanol celulósico nas 6 maiores usinas do mundo. **Novacana**, p. 1–15, 2016.

OLIVEIRA, R. P.; DRIEMEIER, C. CRAFS: A model to analyze two-dimensional X-ray

- diffraction patterns of plant cellulose. **Journal of Applied Crystallography**, v. 46, p. 1196–1210, 2013.
- PARIKKA, M. Global biomass fuel resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 6, p. 613–620, 2004.
- PAWAR, P. M.-A. et al. Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–8, 2013.
- PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 44, 2015.
- ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015.
- RUIZ, H. A. et al. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35–51, 2013.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.
- SENE, C. et al. Fourier-transform raman and fourier-transform infrared spectroscopy (an investigation of five higher plant cell walls and their components). **Plant Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1623–1631, 1994.
- SHEKIRO III, J. et al. Development and characterization of a high-solids deacetylation process. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, p. 1–10, 2016.
- SILVEIRA, R. L. et al. Cellulose aggregation under hydrothermal pretreatment conditions. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 8, p. 2582–2590, 2016.
- SKAAR, C. **Wood-Water Relations**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- SLUITER, J. B. et al. Evaluation of brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 579–585, 2016.
- SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.
- SUN, Q. et al. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 150, p. 1–14, 2014.
- TRAJANO, H. L. et al. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 110, p. 1–16, 2013.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–217, 2005.

ZENG, M. et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (part 1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 390–397, 2012.

CAPÍTULO 2.1: Ganho na digestibilidade da glucana do bagaço de cana pela adição da estratégia de desacetilação alcalina

1 Material e métodos

1.1 Pré-tratamento em meio ácido do bagaço desacetilado e não desacetilado

Após encontrar a melhor condição de desacetilação apenas para o bagaço em escala laboratorial, foi realizado um experimento de pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído fixando a temperatura (140 °C), concentração de ácido (0,5 % v/v H₂SO₄) e variando apenas o tempo da reação (10, 15 e 20 minutos) em duplicata. O tratamento controle (bagaço sem desacetilar) foi realizado nas condições padrão utilizadas no LNBR (0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 15 min). Os parâmetros avaliados nessa etapa foram rendimento de biomassa, composição química do material sólido e do hidrolisado após pré-tratamento. Dessa forma, 30 g de bagaço bruto ou desacetilado (0,4 % m/v NaOH) foi transferido para reator de 0,5 L, onde foi adicionado 300 mL da solução de ácido sulfúrico (0,5 % H₂SO₄), gerando uma razão sólido-líquido (S:L) de 1:10. O reator foi aquecido em banho com glicerina durante o tempo de residência da reação (10, 15 e 20 minutos) a 140 °C. Após a reação, o reator foi resfriado por 10 minutos em banho com gelo e em seguida, o conteúdo do reator foi vertido sobre malha de polipropileno para filtração. Na fração líquida foi determinado xilose, glicose, arabinose, ácido acético e celobiose por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos), usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD). Para determinação de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos, foi utilizado uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4, 8 mm, Thermo). A fração sólida foi lavada exaustivamente com água da torneira para remoção de resíduos da solução, seca em temperatura ambiente e posteriormente caracterizada de acordo com as especificações mencionadas anteriormente (*Seção 7.1.3 Composição química da biomassa*) (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2012b, 2015b).

1.2 Hidrólise enzimática do material pré-tratado

Para os ensaios de hidrólise enzimática, as biomassas úmidas tiveram o pH corrigido para 5,0 com solução de NaOH. Em seguida após correção do pH e determinação da umidade do material, 5 g de biomassa (massa seca) foram adicionados em frascos rosqueados de 100 mL, em seguida adicionado 10 mL de solução tampão citrato de sódio (500 mM Na-Citrato) e em torno de 0,21 mL de celulase comercial (Cellic® CTec2) e a solução final foi completo

para 50 mL com água destilada. A reação ocorreu a 50 °C, 200 rpm de agitação em pH 5,0 e concentração enzimática de 10FPU/ g de glucana com razão sólido-líquido, 1:10 (m/v). As reações foram executadas por 72 horas em triplicata com ponto de coleta a cada 8 e 16 horas (NAKANISHI et al., 2017; SILVA et al., 2016). Após cada período, amostras foram centrifugas por 10 minutos a 4000 rpm em Microcentrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5424 R) e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de glicose por HPLC. A porcentagem de conversão de glucana em glicose após hidrólise enzimática foi calculado de acordo com os procedimento de Nakanishi et al. (2017).

2 Resultados e discussões

2.1 Otimização do pré-tratamento em ácido diluído do material desacetilado

A Tabela 2.1.1 detalha a composição química, rendimento e solubilização do material sólido gerado nessas etapas. Como pode ser observado (Tabela 2.1.1), nos tratamentos com adição da desacetilação alcalina houve menor solubilização dos componentes (32-35 %) em comparação ao tratamento do bagaço apenas em ácido diluído (40 %). A desacetilação alcalina anterior da biomassa removeu vários componentes, o que pode ter influenciado na menor solubilização durante pré-tratamento em meio ácido. Além disso, nos tratamentos com desacetilação houve um leve aumento da solubilização com aumento da severidade, o que era esperado, pois a hidrólise em meio ácido promove solubilização progressiva dos componentes da biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989). Tais dados de solubilização são consistentes com a literatura quanto a utilização do processo combinado (desacetilação+pré-tratamento ácido) (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012c, 2012b, 2014; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SHEKIRO III et al., 2016).

Tabela 2.1.1 – Composição química (% , m/m), rendimento e solubilização nas etapas de apenas pré-tratamento em ácido diluído (0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 15 min) e desacetilação + pré-tratamento ácido (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h → 0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 10, 15 e 20 min)

Tratamento	Rendimento (%)	Solubilização (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Acetil (%)	Cinzas (%)	Balanco
Não tratado	100	0	39,53±0,54	28,52±0,90	23,18±0,31	2,76±0,09	1,29±0,09	94,49
*H ₂ SO ₄ ,15	59,87	40,15	61,46±1,05	6,58±0,07	31,83±0,31	0,42±0,08	2,63±0,04	102,52
Desa/H ₂ SO ₄ ,10	67,97	32,02	69,50±2,09	10,95±0,10	26,44±0,60	0,05±0,01	0,90±0,01	103,81
Desa/H ₂ SO ₄ ,15	66,92	33,07	57,54±5,44	8,97±0,65	27,29±0,10	0,069±0,0	0,78±0,06	102,31
Desa/H ₂ SO ₄ ,20	64,71	35,28	65,59±0,12	8,78±0,02	26,48±0,27	00,00±0,0	0,63±0,09	101,51

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Os dados estão presentes como as médias e os desvios padrão da duplicata experimental. *Condição padrão utilizada no LNBR (0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 15 min). Os cálculos de solubilização foram realizados subtraindo as porcentagens de rendimento de 100 %.

Tabela 2.1.2 – Caracterização do hidrolisado obtido por apenas pré-tratamento em meio ácido (0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 15 min) e desacetilação + pré-tratamento ácido (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h → 0,5 % H₂SO₄; 140 °C; 10, 15 e 20 min)

Tratamento	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Vanilina (g/L)	Ácido siríngico (g/L)	4 - hidroxibenzaldeído (g/L)	Ácido Vanílico (g/L)
H ₂ SO ₄ ,15	1,77±0,00	0,49±0,01	22,24±0,33	2,01±0,03	3,49±0,13	0,016±0,00	0,24±0,01	0,011±0,00	0,009±0,00	0,007±0,03	0,0029±0,00
Desac/H ₂ SO ₄ ,10	1,23±0,10	0,78±0,02	21,13±0,78	2,57±0,00	0,52±0,12	0,007±0,00	0,19±0,01	0,007±0,00	0,005±0,00	0,003±0,00	0,0020±0,00
Desac/H ₂ SO ₄ ,15	1,37±0,08	0,68±0,00	20,99±1,19	2,37±0,05	0,63±0,03	0,011±0,00	0,24±0,01	0,008±0,00	0,006±0,00	0,004±0,00	0,0020±0,00
Desac/H ₂ SO ₄ ,20	1,48±0,02	0,62±0,02	21,56±0,55	2,29±0,03	0,71±0,05	0,013±0,00	0,25±0,01	0,009±0,00	0,006±0,00	0,005±0,00	0,0020±0,00

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: O hidrolisado obtido não foi concentrado. Os dados estão presentes como as médias e os desvios padrão da duplicata experimental.

Quanto a composição química do material sólido, como esperado para pré-tratamento em meio ácido, a hemicelulose foi o polissacarídeo mais susceptível para ambos os tratamentos. No pré-tratamento com adição da desacetilação, pode ser observado um leve aumento de solubilização da hemicelulose com aumento da severidade (Tabela 2.1.1). O aumento da eficiência de solubilização da hemicelulose com o tempo tem sido observado em pré-tratamento em meio ácido na literatura (CANILHA et al., 2011). Lignina total, grupos acetilas e cinzas totais foram significativamente afetados pela adição da etapa de desacetilação antes do pré-tratamento em ácido diluído. Os teores de tais componentes foram reduzidos em torno de 17 %, 90 % e 66 %, respectivamente, em comparação ao pré-tratamento apenas em meio ácido (Tabela 2.1.1). A redução de tais componentes tem sido registrado em outras biomassas, utilizando a estratégia de desacetilação e tal benefício tem sido relacionado a remoção desses componentes na etapa anterior de desacetilação (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012c, 2012b, 2014; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SHEKIRO III et al., 2016).

A fração líquida gerada após as diferentes condições de pré-tratamento em ácido diluído (sem desacetilar e desacetilado) foram caracterizados quanto a concentração de açúcares e inibidores. Quanto aos açúcares, arabinose e celobiose aumentaram no hidrolisado gerado com adição da etapa de desacetilação em comparação ao sem desacetilar e pode ser observado uma leve redução desses componentes com aumento do tempo nesse tratamento (Tabela 2.1.2). Por outro lado, a concentração de glicose reduziu no hidrolisado desacetilado (Tabela 2.1.2). Porém, pode ser observado um leve aumento com o tempo aplicado (Tabela 2.1.2). Esses dados sugerem que a desacetilação alcalina preservou a arabinana na biomassa que foi liberada como arabinose em maior quantidade no pré-tratamento em meio ácido. A menor quantidade de glicose no hidrolisado gerado pela estratégia pode ser explicado pela leve remoção de um tipo de glucana facilmente extraível na etapa de desacetilação (LIMA et al., 2018). Interessantemente, a concentração de xilose não mudou em todas as condições aplicadas (Tabela 2.1.2). Em contrapartida, a maior disponibilidade de xilose no hidrolisado obtido por pré-tratamento ácido com etapa anterior de desacetilação tem sido registrado na literatura (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012b, 2012c).

Quanto aos inibidores, a principal diferença é a redução dos níveis de ácido acético no hidrolisado. Em tais condições houve uma redução em torno de 85 % em comparação ao tratamento apenas em meio ácido (3,49-0,52)(Tabela 2.1.2). A faixa de redução dos níveis de ácido acético no hidrolisado está entre 70-90 % na literatura (CASTRO et al., 2016;

CHEN et al., 2012c, 2012b, 2014; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SHEKIRO III et al., 2016). A estratégia de desacetilação reduziu levemente outros inibidores no hidrolisado, como furfural (0,24-0,19 g.L⁻¹), hidroximetilfurfural (0,016-0,007 g.L⁻¹), vanilina (0,011-0,007 g.L⁻¹), ácido sirínico (0,009-0,005 g.L⁻¹), 4-hidroxibenzaldeído (0,007-0,003 g.L⁻¹) e ácido vanílico (0,0029-0,0020 g.L⁻¹) (Tabela 2.1.2). Além disso, houve um leve aumento de tais componentes com aumento da severidade nesse tratamento (Tabela 2.1.2). A leve redução dos níveis de fenólicos e derivados furânicos no hidrolisado pela estratégia de desacetilação tem sido registrado em outras biomassas (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012c, 2012b, 2014; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SHEKIRO III et al., 2016). Dessa forma, adição da etapa de desacetilação em bagaço de cana-de-açúcar resultou em hidrolisado com baixos níveis de inibidores, tornando uma estratégia interessante para aproveitamento da xilose e da arabinose para várias aplicações no contexto biorrefinaria, como produção de etanol 2G e outros compostos. O experimento foi desenvolvido para escolher o melhor tempo para pré-tratamento em ácido diluído do bagaço desacetilado em escala piloto. Como o tempo não impactou tanto os açúcares quanto os inibidores, o pré-tratamento do bagaço desacetilado em ácido diluído na condição padrão do LNBR foi escolhido (0,5 % v/v H₂SO₄; 140 °C; 15 min).

2.2 Ganho na hidrólise enzimática pela adição da desacetilação alcalina

Após encontrar a melhor condição de pré-tratamento do bagaço em ácido diluído, foi realizado um teste de hidrólise enzimática para avaliar se a desacetilação alcalina melhora a digestibilidade da glucana. A Figura 2.1.1 mostra os ganhos de glicose a partir da hidrólise enzimática da glucana do bagaço de cana-de-açúcar por dois processos distintos (desacetilado e sem desacetilar).

Figura 2.1.1 – Efeito da desacetilação alcalina sobre a hidrólise enzimática da glucana do bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Os dados foram obtidos com 10 FPU/g de glucana para cada tratamento (controle e estratégia). Foi utilizado o coquetel enzimático da novozymes Cellic® CTec2.

Etapa adicional de desacetilação alcalina seguido de pré-tratamento em ácido diluído resultou em conversão de 64 % de glucana em glicose após hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em 72 horas. Por outro lado, apenas 55 % do rendimento de conversão foi encontrado unicamente com pré-tratamento do bagaço em ácido diluído (controle) (Figura 2.1.1). Dessa forma, a estratégia de desacetilação aumentou em cerca de 9 % a digestibilidade da glucana a partir do bagaço de cana-de-açúcar em termos absoluto ou 16 % de aumento levando em consideração a porcentagem inicial (Figura 2.1.1). Além disso, o impacto da desacetilação alcalina já pode ser observado após 24 horas da reação de hidrólise (Figura 2.1.1). Conversão de glucana em glicose entre 10-30 % superior ao tratamento controle tem sido observado em outras biomassas, como palha de milho e de arroz após adição da etapa de desacetilação alcalina (CASTRO et al., 2016; CHEN et al., 2012c, 2012b, 2012a).

A remoção de vários componentes, como grupos acetilas, lignina, extrativos e cinzas pela etapa anterior de desacetilação alcalina resultou na melhora da digestibilidade da celulose do bagaço de cana, provavelmente, pela maior acessibilidade das celulasas a celulose e pelos menores níveis de inibidores enzimáticos. Além disso, dados de publicação anterior sobre desacetilação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar mostraram aumento na porosidade em nanoescala, melhoras em propriedades físicas e enfraquecimento mecânico

do bagaço após desacetilação (LIMA et al., 2018). Tais informações apontam que a desacetilação alcalina proporciona mudanças nanoestruturais importantes o que pode estar relacionado com a melhora na digestibilidade da glucana em bagaço de cana. A vantagem da adição da etapa de desacetilação alcalina em rotas para produção de etanol de segunda geração não está apenas no maior ganho na hidrólise enzimática. Hipoteticamente, tal etapa poderá reduzir, também, a quantidade de enzimas a ser utilizada no processo de sacarificação, reduzindo o custo global.

Referências

- CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 2011.
- CASTRO, R. C. A. et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 1, p. 1–9, 2016.
- CHEN, X. et al. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–14, 2012a.
- CHEN, X. et al. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 70–76, 2012b.
- CHEN, X. et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) experimental. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–10, 2012c.
- CHEN, X. et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–11, 2014.
- GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500–1503, 2009.
- KUNDU, C.; LEE, H. J.; LEE, J. W. Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 28–35, 2015.
- LIMA, C. S. et al. Multiscale alterations in sugar cane bagasse and straw submitted to alkaline deacetylation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3796–3804, 2018.
- NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

ROCHA, G. J. M. et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012.

ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015.

SHEKIRO III, J. et al. Development and characterization of a high-solids deacetylation process. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, p. 1–10, 2016.

SILVA, V. F. et al. Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1853–1859, 2016.

CAPÍTULO 3: Manuscrito submetido ao periódico Fuel Journal

Aumento na produção de bioetanol por *Spathaspora passalidarum* a partir de hidrolisado desacetilado de bagaço de cana-de-açúcar

Cleilton Santos Lima^{1,2*}, Thiago Neitzel², Sarita Candido Rabelo³, Jaciane Lutz lenczack⁴, Inês Conceição Roberto¹ e George J. M. Rocha^{1,2}

(1) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12602-810 Lorena, São Paulo, Brazil;

(2) Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), Centro Nacional de Pesquisas em Energias e Materiais (CNPEM), CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil;

(3) Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, São Paulo, Brazil;

(4) Universidade de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

*E-mail:cleiltonsantoslma@usp.br

Resumo

Spathaspora passalidarum é uma levedura nativa com potencial para produzir bioetanol a partir de xilose e glicose. Porém, tal levedura é sensível aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. Geralmente, para reduzir a inibição uma ou mais etapas de detoxificação do hidrolisado são usadas, tornando o etanol 2G não viável economicamente. A desacetilação alcalina da biomassa anterior ao tratamento ácido tem sido uma alternativa simples e prática para reduzir a toxicidade do hidrolisado, resultando no aumento da produção de bioetanol, como observado em palha de milho e de arroz. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da desacetilação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de etanol por *S. passalidarum*. O hidrolisado desacetilado do bagaço de cana foi obtido da seguinte forma: 1) tratamento alcalino (0,4 % m/v NaOH, 70 °C, 3 h), 2) fração sólida lavada e 3) tratamento em ácido (0,5 % v/v H₂SO₄, 140 °C, 15 min). A fermentação foi realizada em biorreator de 1,5 L a 30 °C com aeração e agitação de 200 rpm por 60 h. A máxima produção de etanol no hidrolisado desacetilado foi de 16,92 g.L⁻¹ com rendimento de 0,30 g.g⁻¹ em 60 h, enquanto que apenas 1,30 g.L⁻¹ de etanol e rendimento de 0,12 g.g⁻¹ foi obtido no hidrolisado não desacetilado. O hidrolisado desacetilado proporcionou aumento de 12 vezes na produção de bioetanol por *S. passalidarum*, confirmando que a desacetilação alcalina é uma estratégia promissora para aumentar a produção de bioetanol, sendo alternativa simples e prática aos métodos clássicos de detoxificação.

Palavras-chave: Bagaço de cana; bioetanol; hidrolisado desacetilado; inibidores;

Spathaspora passalidarum.

1 Introdução

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundante no planeta terra com potencial para produção de biocombustíveis, como alternativa para substituir em parte a demanda por combustíveis fósseis e reduzir as emissões dos gases de efeito estufa (THORNLEY et al., 2015; ZABED et al., 2016). Dessa forma, a produção de bioetanol a partir de biomassas amplamente disponíveis, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar no Brasil é vantajoso, devido à alta produtividade da cana-de-açúcar e sistema de bioenergia consolidado (Zabed et al. 2016; Mandegari et al. 2017). Entretanto, para obtenção de sistemas de produção de etanol de segunda geração sustentáveis e economicamente viável é necessário o aproveitamento integral de todas as frações da biomassa, principalmente celulose, hemicelulose e lignina (SZCZERBOWSKI et al., 2014; ZABED et al., 2017). A glicose é eficientemente usada pela *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol celulósico, a qual é a levedura mais robusta no processo industrial com hexoses (MOYSÉS et al., 2016). Entretanto, a bioconversão de pentoses ainda carece de mais estudos. A conversão eficiente de xilose a etanol é essencial, tendo em vista que é o segundo maior açúcar no material lignocelulósico. Porém, a xilose não é facilmente utilizada como a glicose pela maioria das leveduras, mas para a *Spathaspora passalidarum* tem se observado eficiente fermentação de xilose e glicose a bioetanol em meio sintético (CADETE et al., 2016).

A *S. passalidarum* é uma levedura nativa, pertencente ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e clado CUG-ser (RILEY et al., 2016), isolada inicialmente no intestino de besouros *Odontotaenius disjunctus* (ordem Coleoptera e família Passalidae) no estado de Louisiana (EUA) por NGUYEN et al. (2006). A *S. passalidarum* tem ganhado destaque pelo uso eficiente de xilose, co-fermentar xilose, glicose e celobiose em condições de microaerofilia; possuir xilose redutase (XR) com preferência por NADH que NADPH, o que resolve o problema de desbalanço de cofator e consequente maior produção de bioetanol (CADETE et al., 2016; LONG et al., 2012; SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015).

Tais características tornam a *S. passalidarum* um ótimo candidato para conversão das pentoses e hexoses em bioetanol; entretanto, a baixa tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico em relação a outros microrganismos tem sido um problema (HOU; YAO, 2012). Tais inibidores podem comprometer a eficiência e produtividade de etanol celulósico (VAN DER POL et al., 2014). Os inibidores são formados ou liberados durante a etapa de pré-tratamento e podem ser divididos em ácidos fracos (acético e fórmico), derivados furânicos (hidroximetilfurfural e furfural) e derivados de lignina

(vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico e ferúlico) entre outros (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; VAN DER POL et al., 2014). O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é considerado eficaz e aplicável em larga escala (ROCHA et al., 2015b); entretanto, tal método gera uma quantidade enorme de inibidores em comparação a outros tipos de pré-tratamento (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; VAN DER POL et al., 2014), o que torna importante a adoção de estratégias para minimizar a formação (VAN DER POL et al., 2014).

Existem várias estratégias que podem reduzir os efeitos inibitórios no hidrolisado, dentre os quais pode ser citado a redução da formação de inibidores durante o pré-tratamento ou adoção de métodos de detoxificação do hidrolisado (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016), como físico (evaporação e separação por membrana)(LARSSON et al., 1999), químico (adsorção de carvão ativado, ajustamento de pH e resina de troca iônica)(CANILHA et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; SENATHAM et al., 2016) e tratamento biológico empregando enzimas oxidativas (GUO et al., 2013) e leveduras (FONSECA et al., 2018). Entretanto, etapa adicional de detoxificação do hidrolisado resulta na perda de açúcares e encarece a produção final de etanol pelo aumento dos custos de processo (BUHNER; AGBLEVOR, 2004; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

A desacetilação alcalina da biomassa anterior ao tratamento ácido tem sido uma alternativa simples e prática para reduzir a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico, sem necessidade de etapa clássica de detoxificação ou processamento adicional. Tais etapas acopladas têm beneficiado a produção de etanol celulósico e ácido succínico em várias biomassas, como palha de milho e de arroz (CASTRO et al., 2016; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SALVACHÚA et al., 2016a, 2016b), sobretudo pela eficiente remoção de ácido acético no hidrolisado, o qual é um inibidor em bioprocessos (MORALES et al., 2017). Entretanto, tal estratégia não foi aplicada em bagaço de cana-de-açúcar. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da desacetilação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de bioetanol por *Spathaspora passalidarum*, tendo como hipótese que o hidrolisado desacetilado será menos inibitório a *S. passalidarum* durante fermentação, resultando em maior rendimento e produtividade de bioetanol.

2 Material e métodos

2.1 Preparo do hidrolisado hemicelulósico

Dois hidrolisados diferentes foram preparados. O primeiro foi baseado na desacetilação do bagaço com NaOH seguido de hidrólise em H₂SO₄ (Figura 3.1) executado

na planta piloto do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) de acordo com as especificações de Lima et al. (2018): bagaço (50 % m/m, conteúdo de umidade, adquirido na usina Pedra Agroindustrial, Serrana-SP) foi adicionado em reator de 350 L, juntamente com solução de NaOH (0,4 %, m/v) na proporção S:L, 1:12 (g/mL). A reação ocorreu em pressão atmosférica, 70 °C por 3 h. Após o fim da reação, o material sólido foi lavado, retirado uma alicota para caracterização e submetido posteriormente a reação em H₂SO₄ (0,5 %, v/v) na proporção S:L, 1:10, 140 °C por 15 min em reator de liga metálica de 350 L (Pope Scientific inc, Saukville, USA) (ROCHA et al., 2015b). O segundo hidrolisado chamado de não desacetilado foi obtido apenas pelo pré-tratamento direto em ácido diluído do bagaço (Figura 3.1) (LIMA et al., 2018). Após essa etapa, ambos os hidrolisados foram separados do bagaço por filtração (Nutsche filter, Pope Scientific inc, Saukville, USA) e concentrado 9 vezes por evaporador de filme seco (Pope Scientific inc, Saukville, USA). Para execução dos experimentos das fermentações, o hidrolisado (desacetilado e não desacetilado) foi processado da seguinte forma: 1) Caracterizado por HPLC, 2) ajustado entre pH 4,5-5 com NaOH e 3) esterilizado a 110 °C por 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 7000 rpm por 20 minutos para remoção do material sólido formado e em seguida, novamente, caracterizado e congelado até uso (SANTOS et al., 2016).

Figura 3.1 - Fluxograma do processo usado para produção de bioetanol por *S. passalidarum*

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: O hidrolisado foi produzido em dois processos separados. O hidrolisado desacetilado, foi preparado com uma etapa anterior de desacetilação com NaOH seguido de hidrólise em ácido diluído e o não desacetilado, apenas por hidrólise direta em ácido diluído.

2.2 Rendimento e composição química do bagaço

O conteúdo de cinzas foi determinado por calcinação da biomassa em mufla (SLUITER et al., 2008) e conteúdo de extrativos por extração em Soxhlet com ciclohexano-etanol 1:1 (v/v). A composição química da biomassa foi determinada em duas etapas de hidrólise ácida analítica seguida por filtração. As concentrações de glicose, celobiose, hidroximetilfurfural, ácido fórmico e ácido levulínico foram determinados no filtrado por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos) e usados para conversão no conteúdo de celulose. Similarmente, as concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural foram usados para conversão no conteúdo de hemicelulose. Os açúcares e os ácidos orgânicos foram determinados, usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. As concentrações de hidroximetilfurfural e furfural foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4,8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm). Lignina solúvel foi determinada por espectrofotômetro a 280 nm e lignina insolúvel como resíduo sólido insolúvel após filtração. Lignina total foi determinada como a soma entre a porcentagem de lignina solúvel e insolúvel (SLUITER et al., 2016). Rendimento de biomassa após cada reação foi determinado pela razão entre massa seca de entrada e saída (LIMA et al., 2018).

2.3 Obtenção do isolado e preparação do inóculo

Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907 obtida de solução estoque com glicerol (50 %) a -80 °C foram cultivadas em meio YPX Ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de Ágar) e incubado em estufa a 30 °C por 48 h. Após período, uma colônia foi transferida para meio inóculo e incubado por 48 h, 200 rpm e 30 °C. Foi preparado 180 mL de meio inóculo em duplicata em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura, (10); peptona, (20); uréia, (2,4); KH₂PO₄, (5); MgSO₄•7H₂O, (1); xilose, (10) e glicose, (12) (LONG et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Após período de cultivo, o inóculo foi adicionado no meio de crescimento batelada para propagação das células.

2.4 Propagação

A propagação das células foi realizada em um volume total de 3,6 L em biorreator de 7 L (New Brunswick, Bioflo 115). A propagação foi separada em três etapas: 1) fase batelada, 2) administração de pulso e 2) fase batelada alimentada, com tempo total de 60 h, sendo de aproximadamente 20 h para a fase batelada e cerca de 40 h para a fase de alimentação (LONG et al., 2012). O meio de crescimento na fase batelada conteve (g.L^{-1}): xilose (15), glicose (15), KH_2PO_4 (2,0), uréia (2,4), extrato de levedura (3,0) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0) (LONG et al., 2012). Após 20 h do consumo total dos açúcares, foi adicionado um pulso de KH_2PO_4 ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$) e de uréia ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e a alimentação ligada. O meio de alimentação conteve (g.L^{-1}): extrato de levedura, (3); peptona, (5); xilose, (63,89) e glicose, (63,89) (SANTOS et al., 2016). A porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida entre 40 % e 50 % da saturação para evitar a limitação de oxigênio durante toda etapa de propagação. Após o tempo de propagação (60 h), a alimentação foi interrompida, o meio rico em leveduras centrifugado de maneira estéril a 8000 rpm por 20 min. Após a centrifugação, as leveduras foram ressuspensas em água estéril da torneira e usadas para as fermentações (SANTOS et al., 2016).

2.5 Fermentação

Dois hidrolisados foram usados como tratamento para fermentação em batelada por *Spathaspora passalidarum*: 1) fermentação em hidrolisado não desacetilado e 2) fermentação em hidrolisado desacetilado com duas repetições biológicas e técnicas, totalizando quatro unidades experimentais. A fermentação foi realizada de acordo com o protocolo de Santos et al. (2016) modificado para biorreator de 1,5 L (New Brunswick, Bioflo 115), previamente esterilizado a 121°C durante 20 min e com volume fixo de 0,7 L. Após esterilização, a água foi drenada por meio de bomba peristáltica e o creme de levedura transferido para o biorreator, representando 1/3 (v/v) do volume final de trabalho e 20 g.L^{-1} (base seca) de leveduras no início das fermentações. Em seguida, o hidrolisado hemicelulósico (desacetilado e não desacetilado) com padronização por concentração de glicose e xilose foi utilizado para fermentação. O meio para fermentação foi composto por (g.L^{-1}): glicose, (45); xilose, (77); KH_2PO_4 , (3); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (1); uréia, (2,4) e extrato de levedura, (10). As condições de aeração (0,14 vvm), agitação (200 rpm), temperatura (30°C) e pH entre 4,5-5 foram mantidas (SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). As fermentações foram

executadas por 60 h com períodos de coleta de 12 h. Durante cada período, foram avaliadas massa seca, HPLC e viabilidade celular.

2.6 Procedimentos analíticos

2.6.1 Determinação de massa seca

2 mL de amostra foram adicionados em tubos ependdorfs de mesmo volume e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos em Micro Centrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5424 R). Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do pellet para análise por HPLC (Modelo Infinity 1260, Agilent Technologies, Estados Unidos) e o pellet resultante no tubo, resuspendido em 2 mL de água destilada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos com pellets seco em estufa a 80 °C até peso constante. Ao final da secagem, a massa seca de células foi determinada pela diferença de peso entre tubo ependdorf vazio e com pellet de células após secagem (SANTOS et al., 2016).

2.6.2 Viabilidade celular e brotamento

A viabilidade e o brotamento celular foram determinados pela coloração das leveduras em azul de metileno (0,02 %, m/v) e contagem em diagonal das células vivas, mortas, broto vivo e morto em câmara de Neubauer com microscópio óptico e objetiva de 40x (GILLILAND, 1959). Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo que a viabilidade representa a relação entre células vivas e total de células contadas (1) e o brotamento entre broto vivo e total de células vivas (2).

$$Viabilidade(\%) = \frac{Células\ vivas}{C.vivas+C.mortas} \times 100 \quad (1)$$

$$Brotamento(\%) = \frac{Broto\ vivo}{C.vivas} \times 100 \quad (2)$$

2.6.3 Análise de metabólitos

As concentrações de carboidratos solúveis (glicose, xilose, celobiose e arabinose), álcoois (etanol, xilitol e glicerol) e ácidos orgânicos (acético, fórmico e levulínico) foram determinados no sobrenadante por HPLC, usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD). As concentrações de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos no hidrolisado foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4, 8 mm, Thermo) (SLUITER et al., 2016).

2.6.4 Cálculos dos parâmetros cinéticos

A produtividade volumétrica de etanol (Q_P), rendimento ($Y_{P/S}$), porcentagem de consumo de açúcares (SC) e eficiência de fermentação (FE) foram calculados de acordo com as seguintes equações (3), (4), (5) e (6):

$$Q_P = \frac{[E]_f - [E]_0}{t_f - t_0} \quad (3)$$

Onde $[E]_f$ e $[E]_0$ referem-se à concentração de etanol final e inicial das fermentações e t_f e t_0 aos tempos finais e iniciais das fermentações, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{[E]_f - [E]_0}{[S]_0 - [S]_f} \quad (4)$$

Sendo que $[S]_0$ e $[S]_f$ referem-se as concentrações iniciais e finais de açúcar (xilose ou glicose), respectivamente.

$$SC (\%) = \frac{[S]_0 - [S]_f}{[S]_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde $Y_{P/S}$ e 0.511 g.g^{-1} correspondem ao rendimento de etanol e a conversão estequiométrica de xilose e glicose em etanol por *S. passalidarum*, respectivamente (SANTOS et al., 2016).

$$FE (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0.511} \times 100 \quad (6)$$

2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Origin Pro 8.1.

3 Resultados e discussões

3.1 Comparação da fração sólida e líquida gerada durante desacetilação (processo 1) e sem desacetilação (processo 2)

Figura 3.2 - Diagrama de blocos do processo de desacetilação (→): desacetilação, pré-tratamento, evaporação e fermentação; e sem desacetilação (- ->): pré-tratamento, evaporação e fermentação

Fonte: Arquivo pessoal.

A desacetilação do bagaço de cana-de-açúcar introduziu uma etapa adicional em relação ao tratamento controle; entretanto, gerou uma fração alcalina rica em ácido acético e alguns fenólicos (líquor alcalino). O hidrolisado desacetilado (fração C5) tem consequentemente baixos níveis de tais componentes e, provavelmente, é menos inibitório para fermentação (processo 1, Figura 3.2). Além disso, a glucana presente no material sólido gerado no process 1 pode ser mais digerível, devido à desacetilação remover vários componentes e inibidores na biomassa, assim aumentando a acessibilidade aos carboidratos pelas enzimas. A Tabela 3.1 mostra a composição química do bagaço bruto e o rendimento para desacetilação e para os pré-tratamentos no processo 1 e 2. Após o pré-tratamento combinado do bagaço de cana-de-açúcar pelo processo 1 (desacetilação/pré-tratamento ácido), 16 % de glucana e 85 % de hemicelulose foram solubilizados (Tabela 3.1). O pré-tratamento do bagaço apenas em ácido diluído (processo 2) resultou na solubilização de 22 % de glucana e 88 % de hemicelulose (Tabela 3.1). Etapa adicional de desacetilação resultou na perda de 3 % de hemicelulose e na remoção de 90 % de grupos acetilas no material sólido. Além disso, apenas o processo combinado (processo 1) resultou na remoção de aproximadamente 60 % de cinzas. Portanto, adição da etapa de desacetilação anterior ao pré-tratamento ácido resultou na remoção de grupos acetilas, cinzas, extrativos e pequena proporção de açúcares e lignina. Por outro lado, apenas o pré-tratamento em meio ácido do bagaço não removeu extensivamente o conteúdo de cinzas totais (Tabela 3.1). Resultados similares foram observados após desacetilação alcalina da palha de milho seguido de pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído (CHEN et al., 2012b).

Tabela 3.1 - Composição química (% m/m) do bagaço bruto, apenas desacetilado, desacetilado+pré-tratamento ácido, apenas pré-tratamento ácido e rendimento de todas as etapas

Composição (%)	Bagaço bruto	Desacetilado	^a Desacetilado+pré-tratamento	^b Pré-tratamento
Rendimento	-	88,00	53,39±3,11	50,05±0,55
Celulose	39,53±0,54	45,19±0,35	70,25±5,44	61,46±1,05
Arabinosilana	28,52±1,07	29,89±0,50	8,97±0,65	6,58±0,07
Lignina	23,18±1,31	21,37±0,30	27,29±0,10	31,83±0,31
Cinzas	1,29±0,09	1,20±0,31	0,78±0,06	2,63±0,04
Grupos acetilas	2,76±0,09	0,30±0,08	0,069±0,00	0,42±0,08
Extrativos	5,00±0,10	-	-	-

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: ^aProcesso 1; ^bProcesso 2.

Muitas plantas comerciais produzindo etanol de segunda geração que empregam pré-tratamento em ácido diluído (LYND et al., 2017b), enfrentam os mesmos problemas que incluem os gastos em manutenção dos equipamentos e detoxificação do hidrolisado (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Quanto a detoxificação, foi proposto nesse artigo uma etapa simples e aplicável em larga escala, como alternativa as etapas clássicas de detoxificação, chamada de desacetilação alcalina. Nesse processo, o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido antes em solução alcalina em condições branda (LIMA et al., 2018) e posteriormente pré-tratado em ácido diluído em escala piloto, resultando em hidrolisado com reduzida quantidade de inibidores, especialmente ácido acético e alguns fenólicos. A composição química do hidrolisado desacetilado e não desacetilado foi detalhada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo processo 1(desacetilação) e processo 2 (não desacetilado)

Composição (g.L ⁻¹)	Processo 1	Processo 2
Carboidratos		
Glicose	15,80±0,56	20,24±0,27
Xilose	184,65±0,14	201,12±5,19
Arabinose	11,22±0,45	8,54±0,23
Potenciais inibidores		
Ácidos fracos		
Ácido acético	^b 0,32±0,01	^a 2,63±0,01
Ácido fórmico	^b 0,40±0,02	^a 0,66±0,21
Ácido levulínico	0,10±0,01	0,05±0,07
Derivados furânicos		
(Continua)		

(Conclusão)		
Composição (g.L ⁻¹)	Processo 1	Processo 2
Furfural	^a 0,66±0,01	^b 0,62±1,41
HMF	^b 0,08±0,01	^a 0,13±0,01
Fenólicos		
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,04±0,01	0,05±0,01
Ácido sirínico	0,05±0,01	0,04±0,01
Ácido vanílico	0,04±0,01	0,05±0,01
4-hidroxibenzaldeído	0,07±0,01	0,08±0,01
Vanilina	^b 0,08±0,01	^a 0,10±0,01
Siringaldeído	^b 0,08±0,01	^a 0,29±0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	^b 0,32±0,01	^a 0,58±0,01
Ácido ferúlico	^b 0,24±0,01	^a 0,31±0,01

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Alguns dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto aos açúcares, a xilose foi o componente mais abundante em ambos os hidrolisados (184-201 g.L⁻¹), seguido por glicose (15-20 g.L⁻¹) e arabinose (8-11 g.L⁻¹), respectivamente (Tabela 3.2). O tratamento de desacetilação resultou na perda 8 % de xilose e 21 % de glicose, assim como boa parte dos métodos de detoxificação (CANILHA et al., 2010; CHENG et al., 2008; SENATHAM et al., 2016). Entretanto, a concentração de arabinose aumentou em 23,8 % no hidrolisado desacetilado (Tabela 3.2). Tais dados indicam que entre os açúcares, a arabinana foi o componente mais preservado durante a desacetilação do bagaço de cana-de-açúcar, como observado por Lima et al. (2018), sendo liberado posteriormente em maior quantidade, como arabinose, na etapa de hidrólise ácida. Além disso, parte da glicose obtida durante pré-tratamento ácido do bagaço pode estar relacionada a uma fração facilmente extraível da glucana (LIMA et al., 2018).

A desacetilação alcalina resultou em hidrolisado com reduzidas quantidades de inibidores. Como esperado, a principal diferença entre os hidrolisados é a concentração de ácido acético (Tabela 3.2). O hidrolisado não desacetilado contém cerca de 2,63 g.L⁻¹ de ácido acético, enquanto que o desacetilado possui cerca de 0,3 g.L⁻¹, resultando na remoção de 88 % desse inibidor. Tal porcentagem de remoção já foi relatado em nosso grupo de pesquisa por Lima et al. (2018) no bagaço de cana-de-açúcar desacetilado. Em outras biomassas, a faixa de remoção, no hidrolisado, está entre 70-98 % (CASTRO et al., 2016; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SALVACHÚA et al., 2016b).

A estratégia de desacetilação reduziu significativamente alguns fenólicos (Tabela 3.2). As concentrações de siringaldeído, ácido *p*-cumárico e ferúlico foram reduzidos em 73 %, 45 % e 23 %, respectivamente, no hidrolisado desacetilado em comparação ao não

desacetilado. Esses fenólicos são encontrados formando ligações ésteres com componentes da parede celular, principalmente hemicelulose e lignina. Tais ligações são facilmente rompidas em solução alcalina (OU et al., 2009; XU et al., 2005a) e, possivelmente, a desacetilação alcalina anterior da biomassa removeu parte desses componentes.

A concentração de hidroximetilfurfural, ácido fórmico e outros ácidos fenólicos foram levemente reduzidos no hidrolisado desacetilado (Tabela 3.2). A redução dos níveis de HMF e alguns ácidos fenólicos no hidrolisado desacetilado tem sido relatado em outros estudos (CASTRO et al., 2016; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SALVACHÚA et al., 2016a). Interessantemente, os resultados de composição química encontrado nesse estudo são similares aos observados por outros métodos clássicos de detoxificação de hidrolisado, como resina de troca iônica e eletrodialise (CANILHA et al., 2010; CHANDEL et al., 2007; CHENG et al., 2008). A detoxificação do hidrolisado por resina de troca iônica e eletrodialise, remove preferencialmente ácido acético e em menor proporção fenólicos e furanos (CANILHA et al., 2010; CHANDEL et al., 2007; CHENG et al., 2008). Entretanto, a grande vantagem da desacetilação alcalina, como método alternativo de detoxificação é que esse processo, além de reduzir inibidores, é executado antes do pré-tratamento sem necessidade de mais etapas de detoxificação ou etapa adicional de separação, comumente usado nos métodos clássicos.

3.2 Melhora na produção de etanol por *S. passalidarum* no hidrolisado desacetilado (processo 1)

Após obtenção do hidrolisado em escala piloto pelos processos 1 e 2 (verificar a Figura 3.1), ambos os hidrolisados foram preparados para etapa de fermentação por *S. passalidarum*. Os hidrolisados concentrados foram diluídos até atingir 120 g.L⁻¹ de açúcares redutores (glicos e xilose) e suplementado com extrato de levedura e sais. A Tabela 3.3 mostra a composição química de ambos os hidrolisados (processo 1 e 2) usados para fermentação.

Tabela 3.3 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo processo 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado) após diluição para fermentação

Composição (g.L ⁻¹)	Processo 1*	Processo 2*
Carboidratos		
Glicose	43,89±0,26	44,43±0,90
Xilose	69,02±0,60	79,01±1,80
Arabinose	4,51±0,03	3,35±0,14
Potenciais inibidores		
(Continua)		

(Conclusão)

Composição (g.L ⁻¹)	Processo 1*	Processo 2*
Ácidos fracos		
Ácido acético	^b 0,17±0,01	^a 1,23±0,01
Ácido fórmico	0,12±0,02	0,14±0,01
Ácido levulínico	0,05±0,01	0,06±0,01
Derivados furânicos		
Furfural	^b 0,04±0,01	^a 0,10±0,01
HMF	0,01±0,01	0,04±0,01
Fenólicos		
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,01±0,01	0,05±0,01
Ácido siríngico	0,03±0,01	0,02±0,01
Ácido vanílico	0,01±0,01	0,01±0,01
4- hidroxibenzaldeído	0,02±0,01	0,02±0,01
Vanilina	0,02±0,01	0,02±0,01
Siringaldeído	^b 0,03±0,01	^a 0,12±0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	^b 0,12±0,01	^a 0,24±0,01
Ácido ferúlico	^b 0,09±0,01	^a 0,13±0,01

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: *Hidrolisado suplementado com sais e extrato de levedura foram utilizados para fermentação por *S. passalidarum*. Perfil de massa seca, glicose, xilose e etanol está presente na Figura 3.3; alguns dados da Tabela 3.3 foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 3.3 - Consumo dos açúcares e produção de bioetanol por *S. passalidarum* em hidrolisado obtido pelo processo 1 (A) e 2 (B)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Os dados estão presentes como valores das médias e dos desvios padrão das duas repetições biológicas.

O uso do hidrolisado não desacetilado resultou no consumo de apenas 8 % de glicose e 6 % de xilose até 60 h de fermentação (Figura 3.3 B). Por outro lado, a aplicação do hidrolisado desacetilado resultou no consumo de 83 % de glicose e 25 % de xilose até 60 h de fermentação (Figura 3.3 A). Além disso, a *S. passalidarum* consumiu simultaneamente glicose e xilose; entretanto, consumindo a glicose mais rápido que a xilose nessas condições (Figura 3.3 A). Comportamento fermentativo similar foi observado na literatura por tal levedura nas mesmas proporções de açúcares (LONG et al., 2012; SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). Dessa forma, o hidrolisado desacetilado proporcionou aumento de 9 e 3 vezes no consumo de glicose e xilose, respectivamente, em comparação ao hidrolisado não desacetilado (Figura 3.3 B). O consumo dos açúcares no hidrolisado não desacetilado foi pobre, provavelmente, pela presença de compostos tóxicos em concentrações inibitórias (Tabela 3.3). Por outro lado, a baixa concentração de ácido acético e alguns fenólicos no hidrolisado desacetilado proporcionou benefícios no consumo dos açúcares, evidenciando maior sensibilidade da *S. passalidarum* a esses inibidores. Morales et al. (2017) registraram maior sensibilidade dessa mesma cepa (*S. passalidarum* NRRL Y-27907) a concentrações acima de 1,5 g.L⁻¹ de ácido acético e 0,04 g.L⁻¹ de fenólicos (siringaldeído) em hidrolisado hidrotérmico (explosão a vapor) de *Eucalyptus globulus*. O principal efeito fisiológico dos ácidos fracos na levedura é a redução da disponibilidade de ATP, devido ao gastos energéticos com as bombas de próton para expulsar H⁺ do citosol (GUO; OLSSON, 2014; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990) e compostos de baixa massa molar, tais como os fenólicos podem ser responsáveis por alterar a fluidez da membrana (FITZGERALD et al., 2004). Os mecanismos de bioconversão de inibidores em algumas leveduras tem sido documentado. Inibidores com presença de grupos aldeídos, tais como HMF, furfural, siringaldeído, vanilina e 4-hidroxibenzaldeído são rapidamente convertidos para formas menos tóxicas, geralmente um derivado álcool, usando poder redutor NADH e/ou NADPH (LIU, 2011). Entretanto, ácido *p*-cumárico e ferúlico são lentamente metabolizados por vias catabólicas (ADEBOYE et al., 2015; ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2017). As concentrações de ácido *p*-cumárico e ferúlico foram maiores no hidrolisado sem desacetilar e, provavelmente, podem ter contribuído com a maior inibição celular durante fermentação desse hidrolisado. Arabinose e celobiose não foram consumidos durante fermentação de ambos os hidrolisados (Dados não mostrados).

No hidrolisado desacetilado (processo 1), o consumo de xilose ainda foi lento, evidenciando que outros inibidores não removidos pela estratégia podem reduzir o consumo desse açúcar ou que a presença de glicose reduziu o consumo de xilose. Maior impacto dos

inibidores no consumo de xilose em relação a glicose tem sido observado na literatura (HASUNUMA et al., 2011; MORALES et al., 2017; WANG et al., 2014; YU et al., 2017). Além disso, a redução do consumo de xilose na presença de glicose tem sido bem relatado para tal levedura (LONG et al., 2012; SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015). Provavelmente, a combinação de ambos os fatores fora responsável por reduzir o consumo de xilose.

Figura 3.4 - Porcentagem de viabilidade celular (A) e brotamento (B) durante 60 h de fermentação de hidrolisado obtido pelo processo 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A porcentagem de células viáveis e brotamento em *S. passalidarum* foram determinados durante 60 h de fermentação de hidrolisado desacetilado e não desacetilado (Figura 3.4). A viabilidade celular no hidrolisado não desacetilado sofreu redução significativa ao longo das 60 h de fermentação com máximo decréscimo de 40 % às 12 h. Por outro lado, no hidrolisado desacetilado, células se mantiveram viáveis acima de 80 % durante as 60 h de fermentação (Figura 3.4 A). A formação de brotos por *S. passalidarum* aumentou durante as 60 h de fermentação em ambos hidrolisados; entretanto, não houve diferenças significativas em relação ao tratamento aplicado em cada tempo analisado (Figura 3.4 B). Informações adicionais podem ser obtidas associando os dados de viabilidade celular e brotamento (Figura 3.4, A e B). A formação de broto por *S. passalidarum* durante fermentação do hidrolisado desacetilado pode estar relacionado ao crescimento e reprodução celular, uma vez que a porcentagem de células viáveis nesse hidrolisados se manteve alta (≥ 85 %). Entretanto, no hidrolisado não desacetilado a formação de broto associado com a baixa viabilidade celular (≤ 65 %) pode estar associado com a tentativa falha no crescimento e reprodução durante fermentação, evidenciando maior inibição celular. A redução da

viabilidade e crescimento celular nesse hidrolisado está relacionado a presença de múltiplos inibidores em concentrações inibitórias, os quais afetaram o crescimento e reprodução celular (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Tais dados indicam que o hidrolisado desacetilado foi menos inibitório a *S. passalidarum* durante fermentação a etanol, confirmando a hipótese inicial do trabalho.

3.3 Desempenho fermentativo no hidrolisado desacetilado e não desacetilado

Tabela 3.4 - Parâmetros cinéticos das fermentações por *S. passalidarum* dos hidrolisados obtidos pelos processos 1 (desacetilado) e 2 (não desacetilado) em 60 horas

	Processo 1*	Processo 2*
Concentração de etanol (g.L⁻¹)	16,92±0,08	1,30±0,18
Y_{P/S} (g.g⁻¹)	0,30±0,02	0,10±0,03
QP (g.L⁻¹ h⁻¹)	0,28±0,01	0,01±0,20
EF (%)	59,00±0,02	21,00±0,04
Consumo de glicose (%)	83,00±0,10	8,02±0,20
Consumo de xilose (%)	25,00±0,10	6,11±1,40

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota:*Fermentação de hidrolisado desacetilado (processo 1) e não desacetilado (processo 2) com 20 g.L⁻¹ de células iniciais e aeração de 0,14 vvm. Y_{P/S}, rendimento; QP, produtividade; EF, eficiência de fermentação.

A presença de ácido acético na concentração inibitória e, provavelmente, outros inibidores não removidos no hidrolisado não desacetilado resultaram em baixo consumo dos açúcares pela *S. passalidarum* e conseqüentemente menor produção de etanol (Figura 3.3 B; Tabela 3.4). Produção considerável de etanol foi encontrado apenas durante fermentação do hidrolisado desacetilado (Figura 3.3 A; Tabela 3.4). Em tais condições, a *S. passalidarum* produziu 16,92 g.L⁻¹ de etanol em 60 h de fermentação, com rendimento de 0,30 g.g⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,28 g L⁻¹h⁻¹, alcançando eficiência de fermentação de 59 % do rendimento teórico (Tabela 3.4). Entretanto, no hidrolisado não desacetilado, a máxima concentração de etanol foi de 1,30 g.L⁻¹, com rendimento de 0,12 g.g⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,017 g L⁻¹h⁻¹ (Tabela 3.4). Dessa forma, o uso do hidrolisado desacetilado resultou no aumento de 12 vezes na produção de etanol em comparação ao hidrolisado não desacetilado. Tais ganhos na produção de etanol em hidrolisado desacetilado a partir de palha de milho e de arroz tem sido documentado na literatura (CASTRO et al., 2016; KUNDU; LEE; LEE, 2015; SALVACHÚA et al., 2016a, 2016b).

Concentrações de etanol entre 7,5 e 19 g.L⁻¹ têm sido observado durante fermentação de hidrolisado hemicelulósica de bagaço de cana-de-açúcar detoxificado por resina de troca iônica e eletrodialise, respectivamente (CANILHA et al., 2010; CHANDEL et al., 2007;

CHENG et al., 2008) (Tabela 3.3), os quais são métodos que resultam em benefício similar a desacetilação alcalina. Por outro lado, a desacetilação alcalina resultou em valores superiores de bioetanol em comparação aos métodos, como carvão ativado e apenas por ajustamento de pH (CANILHA et al., 2010; DUSSÁN et al., 2016; FERREIRA et al., 2011; MARTINIANO et al., 2013; SENATHAM et al., 2016)(Tabela 3.3). Tais comparações sugerem que a desacetilação alcalina pode fornecer benefícios similares a alguns métodos clássicos de detoxificação. A Figura 3.5 mostra a formação de bioprodutos durante fermentação de hidrolisado desacetilado (processo 1) e não desacetilado (processo 2) por *S. passalidarum*.

Figura 3.5 - Produção de ácido acético, glicerol e xilitol por *S. passalidarum* durante fermentação de hidrolisado desacetilado (A) e não desacetilado (B)

Fonte: Arquivo pessoal.

A baixa fermentabilidade associada a inibição por ácido acético no hidrolisado não desacetilado resultou em pouca produção de glicerol e nenhuma produção de xilitol por *S. passalidarum* (Figura 3.5 B). Por outro lado, aumento na produção de ácido acético, glicerol e xilitol foram observados durante fermentação de hidrolisado desacetilado (Figura 3.5 A), fato relacionado ao consumo dos açúcares e melhor funcionamento do metabolismo da levedura durante fermentação. Baixa produção de glicerol e xilitol associado a inibição por ácido acético foi observado por Morales et al. (2017). Além disso, a formação de glicerol, um soluto compatível, tem sido observado como resposta das leveduras ao estresse por inibidores presente em hidrolisado lignocelulósico (ARRUDA; HERNÁNDEZ; FELIPE, 2015). Entretanto, a baixa fermentabilidade no hidrolisado não desacetilado não pode ser

relacionado apenas com a presença de ácido acético e alguns fenólicos. Muitos dos compostos orgânicos e inorgânicos determinados na biomassa como extrativos e cinzas totais, respectivamente, provavelmente, são inibidores e podem ter contribuído (DEL RÍO et al., 2015b; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Tabela 3.5 - Produção de etanol por leveduras nativas em hidrolisado (detoxificado ou não detoxificado) obtido por pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em ácido sulfúrico diluído

Detoxificado	Organismo	Açúcar (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Fermentação (h)	Referência
Não	<i>Spathaspora passalidarum</i>	77 xil 45 gli	1,3	0,10	0,01	60	Nesse estudo
Desacetilado	<i>Spathaspora passalidarum</i>	77 xil 45 gli	17	0,30	0,28	60	Nesse estudo
Eletrodialise	<i>Pochysolen tannophilus</i> DW06	45 xil 9,3 gli	19	0,34	0,48	40	Cheng et al. (2008)
Não	<i>Pochysolen tannophilus</i> DW06	42,8 xil 9,1 gli	1,9	0,33	0,05	40	Cheng et al. (2008)
Carvão ativado	<i>Spathaspora passalidarum</i> UFMG- HMD-1.1	50,2 xil 5,3 gli	8,7	0,20	0,09	96	Cadete et al. (2012)
Não	<i>Scheffersomy ces shehateae</i> TTC79	17 xil 12 gli	2,64	0,20	0,04	72	Senatham et al. (2016)
Não	<i>Scheffersomy ces stipitis</i> DSM 3651	23,5 xil 3 gli	4,9	0,20	0,04	120	Canilha et al. (2010)
Carvão ativado	<i>Scheffersomy ces stipitis</i> DSM 3651	20,8 xil 2,7 gli	6,1	0,30	0,13	48	Canilha et al. (2010)
Resina de troca iônica	<i>Scheffersomy ces stipitis</i> DSM 3651	23,6 xil 1,9 gli	7,5	0,30	0,16	48	Canilha et al. (2010)
Carvão ativado	<i>Scheffersomy ces stipitis</i> UFMG-IMH 43.2	75 xil 9 gli	5,9	0,11	0,03	192	Ferreira et al. (2011)

(Continua)

(Conclusão)

Detoxificado	Organismo	Açúcar (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	Fermentação (h)	Referência
Carvão ativado	<i>S. shehatae</i> BR6-2AY	52 xil 3,63 gli	10,96	0,21	0,11	96	Martiniano et al. (2013)
Carvão ativado	<i>Scheffersomyces stipites</i> NRRL Y-7124	50 xil 5,5 gli	1,23	0,053	0,017	72	Dussán et al. (2016)
Carvão ativado	<i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG HM 52.2	49,5 xil 4,5 gli	1,27	0,039	0,017	72	Dussán et al. (2016)

Fonte: Arquivo pessoal.

A estratégia de desacetilação alcalina da biomassa proporcionou aumento na produção de bioetanol por *S. passalidarum* e se equipara aos benefícios dos métodos clássicos de detoxificação (Table 3.5). Esses resultados, também, apontam que nessas condições de fermentação é necessário melhor otimização de aeração para consumo eficiente de xilose. Quanto ao desempenho de *S. passalidarum* no hidrolisado não desacetilado, fica evidente a alta sensibilidade dessa levedura aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico, especialmente ácido acético e alguns fenólicos. Nesse sentido, há necessidades de mais estudos, visando compreender a influência desses inibidores na produção de bioetanol por *S. passalidarum*. A metabolômica tem sido usada, como ferramenta para estudos da influência dos inibidores no consumo de açúcares e na produção de bioetanol (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017). Estratégias, como adaptação evolutiva (NARAYANAN et al., 2016), otimização das condições de aeração durante fermentação (DUSSÁN et al., 2016) e uso de parte de hidrolisado para propagação e posterior fermentação tem sido aplicado com sucesso para contornar a inibição (NIELSEN et al., 2015).

Os resultados obtidos após desacetilação, pré-tratamento e fermentação foram usados para a determinação do balanço de massa de cada processo proposto para produção de etanol, sendo os resultados extrapolados para 1000 kg de bagaço de cana-de-açúcar processados (Figura 3.6). Para uma tonelada de bagaço de cana processada na rota 1 (baseado sobre o rendimento e composição química do material sólido na Tabela 3.1), 301,9 kg de glucana e 36,60 kg de xilana são produzidos. A fração líquida gerada nesse processo possui 88,57 kg

de glicose e 185,94 kg de xilose, correspondendo a 25 % do total de glicose e 83 % do total de xilose presente no material bruto. A fermentação desta fração resulta em 91,47 kg de etanol e 117,27 L de etanol, alcançando 59 % do rendimento teórico possível de produção de etanol a partir de todos os açúcares presente no material. No processo 2, a partir de uma tonelada, unicamente 34,48 kg de etanol e 44,20 L de etanol são esperados de 93,25 kg de glicose e 210 kg de xilose com no máximo 21 % do rendimento teórico de etanol possível e com os açúcares liberados por hidrólise a partir de 309,1 kg de glucana e 36,60 kg de xilana. Tais comparações mostram em última análise a vantagem do processo 1 em relação ao ganho na produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 3.6 - Balanço de massa para desacetilação, pré-tratamento e fermentação nos diferentes processos usados para produção de etanol

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Comparação do processo 1 - (A) (desacetilação/pré-tratamento ácido) com processo 2 - (B) (pré-tratamento ácido) seguido de fermentação com *S. passalidarum*.

4 Conclusões

A produção de bioetanol por *S. passalidarum* a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi aumentada pela estratégia de desacetilação alcalina, fornecendo subsídios para aplicação da desacetilação alcalina, como uma alternativa simples, prática e eficaz aos métodos clássicos de detoxificação. A *S. passalidarum* mostrou-se extremamente sensível aos inibidores presentes no hidrolisado não desacetilado, tornando necessário mais estudos para aumentar a robustez dessa levedura, a qual é um candidato promissor para fermentação em escala industrial de hidrolisado lignocelulósico.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; suporte financeiro do CNPq (455549/2014-1) e apoio do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)(CNPEM/MCTIC) no uso da instalação aberta [Metabolômica (MET) e Bioprocessos (BPC)].

Referências

- ADEBOYE, P. T. et al. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 149, p. 1–14, 2015.
- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. ALD5, PAD1, ATF1 and ATF2 facilitate the catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ARRUDA, P. V.; HERNÁNDEZ, A. F.; FELIPE, M. G. A. Glycerol use as strategy to improve xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **European International Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 93–104, 2015.
- BUHNER, J.; AGBLEVOR, F. A. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 13–30, 2004.
- CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2012.
- CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–14, 2016.

- CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 84–92, 2010.
- CASTRO, R. C. A. et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 1, p. 1–9, 2016.
- CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.
- CHEN, X. et al. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 70–76, 2012.
- CHENG, K.-K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008.
- DEL RÍO, J. C. et al. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 992–1000, 2015.
- DUSSÁN, K. J. et al. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, v. 87, p. 703–710, 2016.
- FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547–554, 2011.
- FITZGERALD, D. J. et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 104–113, 2004.
- FONSECA, B. G. et al. Biotreatment optimization of rice straw hydrolyzates for ethanolic fermentation with *Scheffersomyces stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 19–28, maio 2018.
- GILLILAND, R. B. Determination of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 65, n. 5, p. 424–429, 1959.
- GUO, X. et al. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2013.
- GUO, Z.; OLSSON, L. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 1234–1248, 2014.
- HASUNUMA, T. et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2011.
- HOU, X.; YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora*

passalidarum by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2591–2601, 2012.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1–10, 2013.

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

KUNDU, C.; LEE, H. J.; LEE, J. W. Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 28–35, 2015.

LARSSON, S. et al. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n. 1–3, p. 91–104, 1999.

LIMA, C. S. et al. Multiscale alterations in sugar cane cagasse and straw submitted to alkaline deacetylation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3796–3804, 2018.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, 2011.

LONG, T. M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, p. 5492–5500, 2012.

LYND, L. R. et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202–211, 2017.

MANDEGARI, M. A.; FARZAD, S.; GÖRGENS, J. F. Recent trends on techno-economic assessment (TEA) of sugarcane biorefineries. **Biofuel Research Journal**, v. 4, n. 3, p. 704–712, 2017.

MARTIEN, J. I.; AMADOR-NOGUEZ, D. Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 118–126, 2017.

MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 345–352, 2013.

MORALES, P. et al. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 5–11, 2017.

MOYSÉS, D. N. et al. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and

prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1–18, 2016.

NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

NARAYANAN, V. et al. Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 26 dez. 2016.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232–1241, 2006.

NIELSEN, F. et al. Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 219, p. 1–15, 21 dez. 2015.

OU, S. Y. et al. Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 253–259, 2009.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 375–380, 1990.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.

RILEY, R. et al. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 35, p. 9882–9887, 2016.

ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015.

SALVACHÚA, D. et al. Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 28, p. 1–15, 2016a.

SALVACHÚA, D. et al. Succinic acid production from lignocellulosic hydrolysate by *Basfia succiniciproducens*. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 558–566, 2016b.

SANTOS, S. C. et al. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 319–329, 2016.

SENATHAM, S. et al. Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1040, p. 1–8, 2016.

SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.

SLUITER, J. B. et al. Evaluation of brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 579–585, 2016.

SU, Y. K.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 457–469, 2015.

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.

THORNLEY, P. et al. Maximizing the greenhouse gas reductions from biomass: the role of life cycle assessment. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 35–43, 2015.

VAN DER POL, E. C. et al. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579–9593, 2014.

WANG, X. et al. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 152–164, 2014.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–217, 2005.

YU, H. et al. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 168–175, 2017.

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.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475–501, 2017.

CAPÍTULO 4: Manuscrito em preparação para submissão ao periódico Metabolomics Journal

Perfil metabólico no período adaptativo de *Spathaspora passalidarum* aos múltiplos inibidores durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Cleilton Santos Lima^{1,2*}; Renan Pirolla²; Leandro Vieira dos Santos²; Jaciane Lutz lenczack³; Inês Conceição Roberto¹ e George J. M. Rocha^{1,2}

(1) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12602-810 Lorena, São Paulo, Brazil;

(2) Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil;

(3) Universidade de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

*Correspondence email:cleiltonsantoslima@usp.br

Resumo

Durante fermentação a etanol de açúcares, como glicose e xilose, presentes no hidrolisado lignocelulósico, as leveduras são expostas a vários inibidores, reduzindo drasticamente o consumo de tais açúcares e a produção de etanol. Para distinguir as mudanças metabólicas associadas aos inibidores, foi determinado por LC-MS o perfil metabólico em *S. passalidarum* durante os períodos iniciais da fermentação de hidrolisado com forte carga inibitória, chamado hidrolisado controle (HC) em comparação com hidrolisado menos inibitório (HE). Os inibidores presentes no hidrolisado HC induziram complexos mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a tolerância ao estresse por inibidores em *S. passalidarum*. Extracelularmente, HMF, furfural, ácido fórmico, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído e vanilina foram consumidos, reduzindo a produção de etanol e outros subprodutos. Intracelularmente, os inibidores promoveram uma resposta global no metabolismo, afetando a homeostase energética e balanço redox, traduzidos nos menores níveis de ATP e NADPH. Especificamente, glicólise, via das pentoses fosfato e ciclo de krebs foram afetados, sendo diagnosticado a rota do catabolismo dos aminoácidos glicogênicos, como a principal resposta da célula ao estresse por inibidores, provavelmente, fornecendo intermediários para o ciclo de krebs e repondo NADH/NADPH. Os inibidores alteram o metabolismo dos aminoácidos, balanço energético e redox em *S. passalidarum*, revelando como alvo interessante para engenharia metabólica, visando aumentar a robustez para fermentação de hidrolisado lignocelulósico.

Palavras-chave: Bioetanol; hidrolisado; inibidores; *passalidarum*; perfil metabólico.

1 Introdução

Produção eficiente de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica requer um metabolismo microbiano bem variado com capacidade para aproveitar várias fontes de carbono, como pentoses e hexoses (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Tais necessidades tem levado vários pesquisadores a bioprospectar leveduras nativas, como *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* (CADETE et al., 2012; FERREIRA et al., 2011) que possuem a capacidade de assimilar de forma eficiente várias fontes de carbono presente no hidrolisado, como xilose, arabinose, glicose e celobiose (CADETE et al., 2012; NGUYEN et al., 2006). Somado a isso, obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade para assimilar as diversas fontes de açúcares por meio da engenharia genética tem sido outra alternativa de sucesso (FERNANDES; MURRAY, 2010; WANG et al., 2014). Entretanto, o hidrolisado lignocelulósico obtido após pré-tratamento é uma mistura complexa com diferentes açúcares pentoses e hexoses e vários inibidores, principalmente, ácidos fracos (ácido acético, fórmico e levulínico), derivados furânicos (furfural e hidroximetilfurfural), derivados de lignina (ácido *p*-cumárico, ferúlico, vanílico e entre outros), sais e extrativos (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; ROCHA et al., 2015).

Dessa forma, tais microrganismos seja nativo ou engenheirado precisam ser tolerantes aos inibidores durante fermentação dos açúcares a etanol. Existem várias estratégias que podem reduzir os efeitos inibitórios no hidrolisado, como adsorção de carvão ativado, resina de troca iônica e overliming (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Entretanto, os métodos de detoxificação do hidrolisado são difíceis para aplicação em larga escala e encarecem a produção final de etanol (BUHNER; AGBLEVOR, 2004). Alternativamente, vários esforços têm sido direcionados para desenvolver microrganismos tolerantes aos inibidores, com objetivo de evitar ou reduzir as etapas de detoxificação (ALMARIO; REYES; KAO, 2013; MORALES et al., 2017; SHUI et al., 2015). Além disso, a caracterização do metabolismo de leveduras na presença de inibidores pode ser o primeiro passo para buscar estratégias eficientes, visando aumentar a tolerância.

Estudos com fermentação por *S. passalidarum* de hidrolisado obtido por pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído (CADETE et al., 2012), explosão a vapor (MORALES et al., 2017) e explosão por vapor de amônia (AFEX) (LONG et al., 2012) têm sido realizados. Entretanto, mesmo com a detoxificação do hidrolisado, a produção de etanol é bem abaixo do rendimento teórico, sobretudo no hidrolisado obtido por pré-tratamento em

ácido sulfúrico diluído, evidenciando que *S. passalidarum* é muito sensível aos inibidores e possui baixa robustez em relação a *Saccharomyces cerevisiae* (HOU, 2012), tornando dificultoso sua aplicação em processos industriais. Portanto, melhorar a tolerância de *S. passalidarum* aos inibidores presentes no hidrolisado é essencial. Ademais, compreender a resposta metabólica intracelular poderá fornecer subsídios para aumentar a tolerância e melhorar a produção de etanol de segunda geração.

A endometabolômica tem sido descrita, como o estudo de moléculas endógenas de baixo peso molecular presente em organismo, órgãos, tecidos e células (FIEHN, 2002). Nos últimos anos, avanços em cromatografia, espectrômetro de massas e bioinformática têm possibilitado acurada identificação e quantificação de metabólitos intracelulares e análises de fluxo metabólico em leveduras (ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014), guiando a otimização de vias deficientes por engenharia metabólica, melhora no balanço redox, caracterização do metabolismo de leveduras nativas e engenheiradas (MARTIEN; AMADOR-NOGUEZ, 2017). Tal ferramenta tem sido, também, usada para análise da resposta celular ao estresse com inibidores por meio de alterações de perfis metabólitos intracelulares, fornecendo informações úteis sobre a relação complexa entre leveduras e inibidores (DING et al., 2012, 2011; HASUNUMA et al., 2011).

Entretanto, os estudos com endometabolômica tem sido realizado, principalmente, com *S. cerevisiae* e na presença de inibidores em meio semissintético (DING et al., 2011; DING; ZHOU; YUAN, 2010; WANG et al., 2013); porém, faltam estudos com outras leveduras promissoras, como a *S. passalidarum* em hidrolisado hemicelulósico, o qual é rico em múltiplos inibidores e traduz uma situação real de fermentação de hidrolisado lignocelulósico. Portanto, o objetivo desse artigo foi avaliar a resposta metabólica intracelular e extracelular de *S. passalidarum* aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico durante fermentação dos açúcares a etanol. Para distinguir as mudanças metabólicas associadas aos inibidores, foi determinado o perfil metabólico em *S. passalidarum* durante os períodos iniciais da fermentação de hidrolisado hemicelulósico com forte carga inibitória, chamado hidrolisado controle (HC) em comparação com hidrolisado menos inibitório (HE).

2 Material e métodos

2.1 Reagentes e padrões

Os reagentes e padrões utilizados foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): Metanol; tributilamina; acetonitrila; xilulose-5-fosfato; ribulose-5-fosfato;

ribose-5-fosfato; sedoeptulose-7-fosfato; glicose-6-fosfato; frutose-6-fosfato; frutose-1,6-bifosfato; di-hidroxiacetona fosfato; glicerol-3-fosfato; fosfoenolpiruvato; piruvato; acetil-CoA; ácido cítrico; ácido 2-oxoglutárico; ácido succínico; ácido fumárico; ácido málico; arginina; leucina; isoleucina; fenilalanina; triptofano; asparagina; ácido aspártico; ácido glutâmico; glutamina; ácido 2-furóico; NAD⁺; NADH; FAD⁺; NADP⁺; NADPH; AMP; ADP; ATP; GMP; GDP; GTP.

2.2 Microrganismo e identificação molecular

S. passalidarum NRRL Y-27907 foi adquirida por meio de compra na empresa xylome (Xylome Corporation, USA) e utilizada em todo experimento. *S. passalidarum* foram cultivadas em meio YPD^X Ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de Ágar) e, após incubação em estufa a 30 °C por 24 h, uma colônia foi transferida para 100 mL de meio líquido de mesma composição, porém sem ágar e novamente incubado a 30 °C em estufa por mais 24 h a 200 rpm. Para a identificação molecular, o meio de cultivo líquido foi centrifugado em tubos falcon de 15 mL a 14000 rpm por 10 minutos para obtenção do pellet de levedura. A extração de DNA total foi executada utilizando o KIT Fast DNA for Soil da MPbio e após obtenção do DNA, o material foi submetido a reação por PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA, usando primers universais ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Em seguida, o produto de PCR foi purificado, quantificado utilizando o nanodrop, as bandas foram analisadas em gel de agarose (1 %) para confirmação do tamanho esperado; posteriormente, executado o sequenciamento pela metodologia de Sanger. As sequências obtidas foram montadas e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados (GenBank, NCBI), usando o algoritmo BLASTn. As sequências analisadas apresentaram 99,8 % de identidade com a sequência de ITS de *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345 from TYPE material, sendo caracterizada da mesma espécie.

2.3 Inóculo e propagação

S. passalidarum obtida de solução estoque contendo glicerol (50 %) a -80 °C foi cultivada em meio sólido YPD^X (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de Ágar) e, após incubado em estufa a 30 °C por 48 h. Em seguida, 180 mL do meio inóculo foi preparado em duplicata em frascos Erlenmeyer de 500

mL, contendo (g.L^{-1}): extrato de levedura, (10); peptona, (20); uréia, (2,4); KH_2PO_4 , (5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (1); xilose, (10) e glicose, (12). Uma colônia foi transferida para o meio inóculo e incubado por 48 h, 200 rpm e 30 °C (LONG et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Após período de obtenção do inóculo, este foi adicionado no meio de crescimento para propagação das células. A propagação das células foi realizada de acordo com o protocolo de Santos et al. (2016).

2.4 Preparo do hidrolisado hemicelulósico

Foram preparados dois hidrolisados diferentes na planta piloto do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR). Em uma vertente, o bagaço foi submetido anteriormente a desacetilação alcalina (0,4 % NaOH; 70 °C; 3 h) e depois submetido ao ácido diluído (0,5 % H_2SO_4 ; 140 °C por 15 min) e na outra vertente diretamente ao ácido diluído sem etapa de desacetilação. O hidrolisado desacetilado (HE, hidrolisado obtido pela estratégia) possui menores níveis de inibidores, especialmente ácido acético e alguns fenólicos e os dados completos da obtenção e caracterização do hidrolisado desacetilado e não desacetilado (HC, hidrolisado controle) podem ser consultados em publicações anteriores (LIMA et al., 2018). Após o preparo, o hidrolisado foi caracterizado por HPLC, ajustado entre pH 4,5-5 com NaOH e esterilizado a 110 °C por 15 minutos. Posteriormente, foi centrifugado a 7000 rpm por 20 minutos para remoção do material sólido formado. Em seguida, foram novamente caracterizados e congelados para uso até as fermentações (NAKANISHI et al., 2017).

2.5 Fermentação

As fermentações dos hidrolisados foram realizadas em batelada simples de acordo com o protocolo de Nakanishi et al. (2017) e Santos et al. (2016) modificado em biorreator de 1,5 L (New Brunswick, Bioflo 115), previamente esterilizado a 121 °C durante 20 minutos e com volume fixo de 0,7 L. Em seguida, os hidrolisados foram padronizados por concentração de glicose e xilose, suplementados e adicionados em biorreator para fermentação por 72 h. O meio para fermentação foi composto por (g.L^{-1}): glicose, (45); xilose, (77); KH_2PO_4 , (3); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (1); uréia, (2,4) e extrato de levedura, (10). Após adição dos hidrolisados suplementados, o creme de levedura foi transferido para o biorreator, representando 1/3 (v/v) do volume final de trabalho e 20 g.L^{-1} (base seca) de leveduras no

início das fermentações. Todo experimento foi realizado com três repetições biológicas independentes. As fermentações foram mantidas a 30 °C, 200 rpm e pH entre 4,5-5.

2.6 Preparo da amostra

2.6.1 Amostragem, quenching e extração

As amostras foram retiradas nas 12 horas iniciais das fermentações, com intervalo de 4 h (0, 4, 8 e 12 h). O quenching celular foi realizado com solução de metanol (MeOH:H₂O 60 %, v/v) a -40 °C mantido em banho criogênico de acetonitrila e gelo seco. Para tal, 4 mL de meio de cultivo foram adicionados em 20 mL de solução de quenching a -40 °C e mantido a essa temperatura por 3 minutos e, então, centrifugados por 3 minutos a 3200 g e -9 °C. Aos pellets centrifugados após quenching (± 80 mg, massa seca), foram adicionados 5 mL da solução de extração (etanol: H₂O 75 % e tampão HEPES 10 mM pH 7,5) e mantidos a 80 °C por 3 minutos. Após esse período, amostras foram transferidas para o banho criogênico a -40 °C por 3 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 4000g e -9 °C. Os sobrenadantes foram estocados a -80 °C. As amostras foram concentradas em SpeedVac (Centrivap DNA concentrator, Labconco), os volumes ajustados para 0,2 mL com água ultrapura e estocadas em freezer a -80 °C até análise por LC-MS (CANELAS et al., 2008; CARNEIRO; PEREIRA; ROCHA, 2014; GONZALEZ; FRANÇOIS; RENAUD, 1997).

2.6.2 Análise de metabólito intracelular por LC-MS

As análises foram determinadas por UHPLC-MS (Thermo Scientific, LTQ XL linear Ion Trap Mass Spectrometer), com fonte ESI (“electrospray ionization”), operando em modo negativo (ESI-). O equipamento foi utilizado com voltagem no capilar de 3500 V, temperatura de dessolvatação 300 °C, fluxo do gás no cone de 35 unidades arbitrárias e de gás auxiliar de 10 unidades arbitrárias. A separação cromatográfica dos metabólitos foi realizada em coluna de fase reversa Waters HSS T3 (2.1 x 150 mm x 1.8 μ m) e gradiente de fase móvel A (10 mM tributilamina, 15 mM ác. acético, 97:3 H₂O:MeOH) e B (MeOH) (CRUTCHFIELD et al., 2010).

2.6.3 Determinação extracelular de inibidores, açúcares e etanol

2 mL de amostras foram retiradas e adicionados em tubos eppendorfs de mesmo volume e centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos em Micro Centrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5424 R). Após centrifugação, o sobrenadante foi separado para análise por HPLC (Infinity Model 1260, Agilent Technologies, USA). As concentrações dos açúcares (glicose,

xilose, arabinose e celobiose), álcoois (etanol, xilitol e glicerol) e ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico e levulínico) foram determinados no sobrenadante, usando uma coluna de troca iônica HPX 87H (300 mm × 7.8 mm, BIO-RAD) como fase estacionária e H₂SO₄ (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo 0,6 mL/min a 35 °C como fase móvel e índice de refração como detector. As concentrações de hidroximetilfurfural, furfural e ácidos fenólicos no hidrolisado foram determinados, utilizando uma coluna Acclaim 120 - C18 (150 mm × 4,8 mm, Thermo) como fase estacionária e solução de acetonitrila-água 1:8 % e 1 % de ácido acético com fluxo de 0,8 mL/min a 25 °C como fase móvel, usando detector de Uv-vis (274 nm) (ROCHA et al., 2012, 2015).

2.6.4 Análise estatística

O MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018) foi utilizado para processamento e análise de todos os dados obtidos. Estatística multivariada com método supervisionado por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*) foi empregado para análise das diferenças entre os tratamentos. Análise de cluster com Heatmap foi utilizado para visualização das diferenças entre cada metabólito específico e a Curva ROC (do inglês, Receiver Operating Characteristic) para diagnóstico de possíveis biomarcadores associados ao estresse. Interpretação biológica foi realizada, usando a ferramenta integrada análise de impacto de vias.

3 Resultados

3.1 Efeito fisiológico dos inibidores durante fermentação de hidrolisado

A viabilidade celular, a qual representa a habilidade da célula de sustentar atividade metabólica e se reproduzir, foi determinada pela coloração das células em azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico (40x). A Figura 4.1 mostra o efeito dos inibidores presente no hidrolisado hemicelulósico na fisiologia de *S. passalidarum*. A porcentagem de células viáveis se manteve acima de 80 % no hidrolisado HE durante 72 horas de fermentação (Figura 4.1 A). Por outro lado, a porcentagem de células viáveis no hidrolisado HC reduziu significativamente, ficando abaixo de 70 % (Figura 4.1 A). Não houve diferenças estatística na porcentagem de brotamento em *S. passalidarum* entre hidrolisado HE e HC (Figura 4.1 C e D). O efeito dos inibidores na viabilidade celular em *S. passalidarum* no hidrolisado HC pode ser observado nos períodos iniciais das

fermentações (Figura 4.1 B), sendo extremamente significativo durante as 12 horas, reduzindo em até 40 %. Portanto, é esperado resposta dos inibidores no metabolismo de *S. passalidarum* nos primeiros momentos de fermentação do hidrolisado HC.

Figura 4.1 - Viabilidade (A e B) e brotamento celular (C e D) durante as 72 horas de fermentação de hidrolisado HE e HC por *S. passalidarum*

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Os dados estão presentes como média e desvio padrão das três repetições biológicas. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Hidrolisado, HE: hidrolisado obtido após etapa de desacetilação do bagaço com NaOH seguido de pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído; Hidrolisado, HC: hidrolisado controle obtido apenas com pré-tratamento do bagaço direto em ácido sulfúrico diluído.

3.2 Redução na produção de etanol durante fermentação de hidrolisado

As fermentações com *S. passalidarum* no hidrolisado HE e no hidrolisado HC foram executadas durante 72 horas (Figura 4.2; Tabela 4.1). Enquanto que na fermentação do hidrolisado HE quase não houve fase lag, no hidrolisado HC esta fase se estendeu por mais de 72 horas (Figura 4.2; Tabela 4.1). No hidrolisado HE, a máxima produção de etanol foi de 16 g.L^{-1} com rendimento de $0,28 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,22 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, a máxima produção de etanol no hidrolisado HC foi de $1,74 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 4.2; Tabela 4.1) com rendimento de $0,11 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,01 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.2; Tabela 4.1). O consumo de glicose e xilose no hidrolisado HE alcançou 90 % e 28 %, respectivamente, em 72 horas (Figura 4.2; Tabela 4.1). Entretanto, no hidrolisado HC, o consumo de glicose e

xilose foi praticamente inibido durante toda fermentação (Figura 4.2; Tabela 4.1). Tais dados relatam uma drástica redução na produção de etanol e consumo de açúcares durante fermentação do hidrolisado HC. Em virtude desse efeito inibitório, foi realizado um estudo voltado para avaliar o potencial de *S. passalidarum* em converter inibidores em formas menos tóxicas durante fermentação e o entendimento em nível de metabolismo através da endometabolômica para compreender a resposta celular aos múltiplos inibidores.

Figura 4.2 - Perfil do consumo de glicose e xilose por *S. passalidarum* em hidrolisado HE (A) e hidrolisado HC (B)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.1 - Parâmetros cinéticos das fermentações por *S. passalidarum* dos hidrolisados HE e HC em 72 horas

	Hidrolisado HE*	Hidrolisado HC*
Etanol (g.L ⁻¹)	16,00±0,08	1,74±0,18
Rendimento (g.g ⁻¹)	0,28±0,02	0,11±0,04
Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	0,22±0,01	0,01±0,20
Rendimento teórico (%)	53,00±0,02	21,00±0,02
Consumo de glicose (%)	89,52±0,10	8,50±1,00
Consumo de xilose (%)	27,70±0,10	5,71±1,40

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: *Consultar Lima et al. (2018) quanto ao preparo de tais hidrolisados (HE e HC). As fermentações foram executadas com 20 g.L⁻¹ de células no início das fermentações e com aeração de 0,14 vvm.

3.3 Capacidade de biodetoxificação de inibidores

Apesar de não ocorrer consumo de glicose e xilose no hidrolisado HC, o metabolismo de *S. passalidarum* mostrou-se bem ativo, devido a maior atividade de vias responsáveis pela detoxificação dos inibidores (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Capacidade de bioconversão de inibidores por *S. passalidarum* durante fermentação de hidrolisado HE (A e B) e HC (C e D)

Fonte: Arquivo pessoal.

Independentemente do hidrolisado usado, ácido fórmico, hidroximetilfurfural, furfural, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram consumidos durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico nessas condições (Figura 4.3). As concentrações de ácido levulínico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido siringico, ácido vanílico e ácido 4-hidroxibenzóico não sofreram modificações durante fermentação (Figura 4.3). Dessa forma, a *S. passalidarum* possui a capacidade de metabolizar os grupos aldeídos presentes em derivados furânicos e alguns fenólicos. Entretanto, parece não metabolizar a maioria dos ácidos fracos nessa condição, com exceção do ácido fórmico. Além disso, a maioria dos inibidores que foram metabolizados, tiveram sua conversão em um período de até 12 horas, tornando interessante o estudo do metabolismo nessa fase.

3.4 Resposta global do metabolismo aos inibidores

Um total de 35 metabólitos intracelulares foram identificados e quantificados por LC-MS durante as 12 horas iniciais de fermentação, incluindo açúcares fosforilados, ácidos orgânicos, aminoácidos e nucleotídeos. Análise estatística multivariada por PLS-DA registrou diferenças durante período de fermentação de hidrolisado HE e HC, indicando diferentes perfis metabólicos em resposta aos hidrolisados usados e ao tempo aplicado (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Diferenças entre os tratamentos analisado por PLS-DA

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: HC (4, 8 e 12 h), hidrolisado controle, o qual não ocorreu fermentação por *S. passalidarum*; HE (4, 8 e 12 h), hidrolisado obtido pela estratégia de desacetilação alcalina, o qual fermentou durante período analisado.

3.4.1 Análise de impacto de vias

Análise de impacto de vias foi realizada, usando a ferramenta online e integral MetaboAnalyst, a qual comparou as alterações das concentrações de 35 metabólitos em *S. passalidarum* durante fermentação de hidrolisado HE e HC apenas no tempo de 12 h e estimou possíveis alterações em determinadas vias, ajudando no melhor entendimento da

influência dos inibidores no metabolismo de tal levedura. Como pode ser observado na Figura 4.5, as principais vias alteradas durante fermentação de hidrolisado lignocelulósico foram catabolismo de leucina, isoleucina e valina, metabolismo dos ácidos graxos, piruvato, purinas e glutamato. Além disso, também, tiveram alta significância a glicólise, gliconeogênese, via das pentoses fosfato e ciclo de krebs.

Figura 4.5 - Análise de impacto de vias em *S. passalidarum* durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: No eixo X, fator de impacto nas vias determinado por análise topológica e no eixo Y, $-\log(P\text{-valor})$ determinado por análise quantitativa de enriquecimento, onde as vias com maior significância estatística possuem maior valor de $-\log(P)$ e alto fator de impacto. As amostras foram retiradas no período de 12 h comparando tratamento HC com HE.

3.5 Resposta específica do metabolismo aos inibidores

Heatmap foi utilizado para descrever de forma detalhada as variações dos metabólitos durante fermentação de hidrolisado HE e HC. A Figura 4.6 detalha as principais diferenças dos perfis metabólicos encontrados entre os tratamentos, os quais foram diagnosticados anteriormente por PLS-DA.

Figura 4.6 - Heatmap dos metabólitos alterados em *S. passalidarum* durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico no período adaptativo

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: No eixo X, tratamento HC e HE (4, 8 e 12 h) e no eixo Y, concentração de metabólitos alterados com o tempo.

Os inibidores afetaram as vias relacionadas ao metabolismo central do carbono, como glicólise, via das pentoses e ciclo de krebs. Por consequência, o metabolismo dos aminoácidos e nucleotídeos foram, também, afetados (Figura 4.6). Os níveis de intermediários da glicólise, como glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfato,

di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP) e piruvato foram menores no hidrolisado HE, sobretudo após 4 horas de fermentação, indicando maior fluxo na glicólise. Entretanto, no hidrolisado HC, tais componentes acumularam, indicando impacto direto dos inibidores nos principais intermediários da glicólise. Os níveis de fosfoenolpiruvato foram elevados durante fermentação de hidrolisado HE e menores durante fermentação de hidrolisado HC (Figura 4.6). Além disso, acúmulo de DHAP e menores níveis de glicerol-3-fosfato no hidrolisado HC, indicam alterações no metabolismo do glicerol influenciado pelos inibidores presentes nesse hidrolisado (Figura 4.6).

Na via das pentoses fosfato, durante fermentação de hidrolisado HE, intermediários, como xilulose-5-fosfato, ribulose-5-fosfato, ribose-5-fosfato e sedoheptulose-7-fosfato; assim como, intermediários que conectam essa via com a glicólise, como glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato tiveram menores níveis, indicando maior fluxo nessas vias. Por outro lado, durante fermentação de hidrolisado HC, esses intermediários foram acumulados, indicando efeito dos inibidores tanto na via não-oxidativa das pentoses quanto nos intermediários entre essa via e a glicólise (Figura 4.6). Quanto ao ciclo de krebs, maiores níveis de acetil-CoA, succinato, fumarato e malato foram registrados durante 12 horas de fermentação do hidrolisado HE (Figura 4.6). Por outro lado, a fermentação do hidrolisado HC resultou em baixos níveis desses componentes (Figura 4.6), sendo associado esses menores níveis dos intermediários, como principal efeito dos inibidores no ciclo de krebs.

Em relação aos aminoácidos avaliados, menores níveis de glutamato, arginina e asparagina foram registrados durante 12 horas de fermentação do hidrolisado HC em comparação ao hidrolisado HE (Figura 4.6). Entretanto, maiores níveis de fenilalanina, triptofano, aspartato e leucina/isoleucina foram encontrados durante fermentação de hidrolisado HC. Tais dados sugerem uma relação entre catabolismo dos aminoácidos glicogênicos, como glutamato, arginina e asparagina para reposição de intermediários do ciclo de krebs, como resposta ao intenso estresse por inibidores no hidrolisado HC. Além disso, o acúmulo de fenilalanina, triptofano, aspartato e leucina/isoleucina nesse hidrolisado podem ser, também, potenciais indicadores de maior estresse. Dessa forma, os inibidores afetam o metabolismo dos aminoácidos avaliados, sendo importante resposta celular ao maior estresse por inibidores.

Os níveis de ATP, GTP, ADP, GMP, NADPH, NADP^+ e FAD^+ aumentaram durante fermentação de hidrolisado HE em comparação ao hidrolisado HC durante as 12 horas de fermentação; enquanto que nesse período, os níveis de GDP, AMP, NADH e NAD^+ foram maiores no hidrolisado HC (Figura 4.6). Os inibidores presentes no hidrolisado HC afetaram

o balanço energético e o potencial redox celular, sendo traduzido nos menores níveis de ATP e NADPH. Inesperadamente, os níveis de NADH foram maiores no hidrolisado HC, indicando acúmulo durante intenso estresse por inibidores. Além disso, acúmulo de AMP no hidrolisado HC, indica uma possível importância desse componente, como resposta ao maior estresse por inibidores. Dessa forma, os inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico alteram o metabolismo das purinas em *S. passalidarum*, como sugerido pela análise de impacto de vias (Figura 4.5). Em resumo, o metabolismo de *S. passalidarum* foi severamente afetado durante fermentação do hidrolisado HC, devido à intensa influência dos múltiplos inibidores presentes nesse hidrolisado.

3.6 Identificação de potenciais biomarcadores

Para identificar os potenciais biomarcadores associados ao maior estresse por inibidores, foram selecionados os principais compostos que sofreram variações durante as fermentações dos hidrolisados HE e HC apenas no tempo de 12 h através da análise pelo algoritmo da Curva ROC. A Figura 4.7 relata os principais biomarcadores associados ao maior estresse por inibidores, usando algoritmo da Curva ROC para discriminação e PLS-DA para visualização dos resultados. Como pode ser observado na Figura 4.7, os principais compostos com potencial para serem biomarcadores associados ao estresse por inibidores em *S. passalidarum* foram AMP, fenilalanina, NAD^+ , NADH e glutamato, tendo maior importância relativa AMP e fenilalanina (Figura 4.7). No hidrolisado mais inibitório, menores níveis de glutamato associado ao acúmulo de NADH, indicam forte impacto dos inibidores no catabolismo dos aminoácidos glicogênicos e no potencial redox da célula. Além disso, acúmulo de fenilalanina e triptofano nessas condições, pode ser associado, como uma resposta importante ao maior estresse por inibidores. Alterações nos níveis de AMP durante fermentação de hidrolisado HE e HC, podem indicar influência dos inibidores no balanço energético celular.

Figura 4.7 – Potenciais biomarcadores em *S. passalidarum* associados ao estresse por inibidores durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: No eixo X, importância relativa do biomarcador determinada pela Curva ROC e no eixo Y, biomarcadores selecionados. A importância relativa dos biomarcadores é marcada em cores no gráfico acima, o qual classifica em alto, com maior potencial para ser biomarcador em determinado tratamento e baixo, com menor potencial. As amostras foram retiradas no período de 12 h comparando tratamento HC com HE.

4 Discussões

Os inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico mais letal promoveram várias implicações fisiológicas em *S. passalidarum*, como inibição do consumo de glicose e xilose e redução da viabilidade celular, o que resultou em menor fluxo dos intermediários em diversas vias e consequentemente baixa produção de etanol e outros subprodutos. A inibição do consumo dos açúcares e baixa produção de etanol tem sido registrada, em outros estudos, durante fermentação de hidrolisado lignocelulósico (HOU; YAO, 2012; MORALES et al., 2017). De forma geral, fisiologicamente, os inibidores afetam o crescimento e reprodução celular (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016). O prolongamento da fase lag está consistente com o período de adaptação aos inibidores, sendo período importante para compreensão da resposta do metabolismo celular ao estresse (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014; WANG et al., 2014).

A fase lag durante fermentação do hidrolisado HC por *S. passalidarum* se estendeu por mais de 72 horas, enquanto que na fermentação do hidrolisado HE quase não houve fase

lag, indicando forte influência dos inibidores presente nesse hidrolisado no metabolismo celular durante toda fermentação. Durante a fase lag, vários mecanismos fisiológicos e moleculares são responsáveis por minimizar os efeitos dos inibidores, sendo importante o estudo de tais processos (DING et al., 2012; WANG et al., 2013, 2014).

Apesar de várias implicações fisiológicas negativas durante fermentação do hidrolisado HC, a *S. passalidarum* exibiu a capacidade de conversão de derivados furânicos e alguns fenólicos em formas menos tóxicas. Extracelularmente, hidroximetilfurfural, furfural, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram completamente consumidos em menos de 12 horas em ambos os hidrolisados, indicando a presença da atividade de enzimas aldeído redutases que contribuem para bioconversão de compostos com grupos aldeídos em formas menos tóxica (LIU, 2011). Atividade de enzimas, como álcool desidrogenase (ADH1, ADH6 e ADH7), aldeído desidrogenase (ALD4), metilglioxal redutase (GRE2) e xilose redutase (XR) têm sido relacionada a detoxificação de compostos com grupos aldeídos (LIU, 2011). Além disso, o aumento intracelular da concentração de ácido 2- furóico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico (HE e HC) confirma a bioconversão de derivados furânicos, como furfural (Figura 4.3). A bioconversão de grupos aldeídos presentes em derivados furânicos e fenólicos em formas menos tóxicas tem sido registrada com outras leveduras (ADEBOYE et al., 2015; ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014, 2017; ASK et al., 2013). Geralmente, tais enzimas usam poder redutor na forma de NADH/NADPH, convertendo os grupos aldeídos em uma forma álcool (LIU, 2011). Tais dados são sustentados pela determinação dos níveis de NADPH, os quais foram menores durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico HC e maiores no hidrolisado HE.

Interessantemente, dentre os ácidos fracos, apenas o ácido fórmico foi consumido completamente durante fermentação (Figura 4.3). Resultados similares foram encontrados com a mesma cepa utilizada nesse estudo (MORALES et al., 2017). Tais dados indicam, provavelmente, a atividade da enzima formato desidrogenase em *S. passalidarum*, a qual é responsável pela oxidação do formato a dióxido de carbono, usando cofator NAD^+ . A oxidação do formato é a etapa final da via de oxidação do metanol em leveduras metilotróficas (YURIMOTO; OKU; SAKAI, 2011). Entretanto, em leveduras não metilotróficas, como *S. passalidarum*, essa enzima participa da via de detoxificação do formato exógeno presente no hidrolisado lignocelulósico (OVERKAMP et al., 2002). Os demais ácidos orgânicos e fenólicos não sofreram modificações em sua estrutura, uma vez que não houve consumo durante fermentação (Figura 4.3). Porém, os mecanismos

fisiológicos envolvidos com a tolerância aos ácidos fracos estão relacionados a manutenção da homeostase intracelular do pH proporcionado pelos gastos com ATP por H⁺-ATPases para expulsar os prótons liberados no citosol (GUO; OLSSON, 2014; PALMA; GUERREIRO; SÁ-CORREIA, 2018). Notavelmente, os níveis de ATP e GTP foram menores durante fermentação do hidrolisado mais inibitório, corroborando essa hipótese. Os menores níveis de ATP em leveduras expostas aos múltiplos inibidores foram encontrados em outros estudos (ASK et al., 2013; GUO; OLSSON, 2014; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990).

Em análise mais detalhada do efeito dos inibidores no metabolismo de *S. passalidarum*, o baixo consumo de glicose e xilose associado ao acúmulo dos principais compostos intermediários na via das pentoses e glicólise, indica bloqueio em intermediários importantes dessas vias e consequentemente baixo fluxo. O impacto dos inibidores no acúmulo de alguns intermediários bioquímicos e redução de fluxo nessas vias foi relatado em outros estudos (DING et al., 2012; HASUNUMA et al., 2011; WANG et al., 2013). Na glicólise, acúmulo de glicose-6-fosfato, frutose-1,6-bifostato, DHAP e piruvato, indicam inibição da atividade das enzimas fosfohexose isomerase, aldolase, triose-fosfato isomerase e piruvato cinase (Figura 4.6). A inibição da atividade de enzimas importantes nessa via, tais como hexocinase, fosfofrutocinase-1 e enolase tem sido relatada na presença de ácidos fracos e derivados furânicos em outros estudos (ASK et al., 2013; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990). Na via das pentoses fosfato, acúmulo de intermediários envolvidos na rota não-oxidativa, como sedoheptulose-7-fosfato, xilulose-5-fosfato, ribulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato, indica inibição da atividade de diversas enzimas envolvidas nessa fase, tais como transaldolase, transcetolase, epimerase e isomerase (Figura 4.6). A inibição das atividades das enzimas transcetolases e transaldolases foram registradas em *Saccharomyces cerevisiae* na presença de ácido acético (HASUNUMA et al., 2011).

Durante fermentação do hidrolisado mais inibitório, os menores níveis dos principais intermediários do ciclo de krebs, indicam que durante estresse essa via se manteve ativa mesmo com baixo fluxo na via das pentoses e glicólise. Os menores níveis de intermediários do ciclo de krebs tem sido registrado na presença de ácido acético, furfural e fenol em outros estudos (DING et al., 2012, 2011). Além disso, os maiores níveis de NADH relatado nesse estudo, no hidrolisado mais inibitório, associado aos menores níveis de alguns aminoácidos glicogênicos, tais como glutamato, arginina e asparagina, indicam que o catabolismo desses aminoácidos manteve ativo o ciclo krebs, repondo alguns intermediários importantes. Em

outros estudos, o catabolismo dos aminoácidos glicogênicos tem sido sugerido, como principal via de reposição de intermediários do ciclo de krebs na presença de inibidores (DING et al., 2012, 2011; WANG et al., 2013, 2014), fortalecendo essa premissa. Dentre os aminoácidos glicogênicos, a rota do catabolismo do glutamato tem sido frequentemente sugerida, como via importante para maior tolerância aos inibidores, fornecendo poder redutor extra (NADPH) e intermediários para o ciclo de krebs, como succinato e α -cetoglutarato (COLEMAN et al., 2001; WANG et al., 2013, 2014). Assim, a rota do catabolismo dos aminoácidos glicogênicos, pode ser associada, como resposta importante do metabolismo celular aos múltiplos inibidores.

Notavelmente, acúmulo de fenilalanina, triptofano, aspartato e leucina/isoleucina durante fermentação do hidrolisado mais inibitório pode ser indicador de estresse aos inibidores. Acúmulo de aminoácidos na presença de múltiplos inibidores foi relacionado a degradação de proteínas anormais formadas, como resultado as condições de estresse (DING et al., 2012, 2011). Alternativamente, acúmulo de triptofano e tirosina tem sido associado, como protetor da integridade da membrana plasmática na presença de detergentes (SCHROEDER; IKUI, 2019). Os fenólicos são os principais inibidores associados ao rompimento da membrana plasmática (DING et al., 2011; FITZGERALD et al., 2004). Dessa forma, acúmulo de alguns aminoácidos aromáticos pode estar associado a um possível mecanismo de proteção da membrana plasmática a presença dos fenólicos. Interessantemente, o hidrolisado HC possui maiores níveis de ácido *p*-cumárico, ferúlico e siringaldeído.

Os níveis de glicerol-3-fosfato foram menores durante fermentação do hidrolisado mais inibitório, indicando desvio da rota do glicerol-3-fosfato para formação de glicerol, como resposta ao maior estresse por inibidores, tal qual observado em outros estudos (DING et al., 2012; WANG et al., 2014). Entretanto, a menor produção extracelular de glicerol, xilitol e etanol durante fermentação desse hidrolisado, indica que o poder redutor na forma de NADPH/NADH, importante para produção desses polióis, seja preferencialmente direcionado para bioconversão dos inibidores com grupos aldeídos.

A importância relativa dos biomarcadores, como glutamato, NAD^+ e NADH, diagnosticado pela Curva ROC, revela uma possível importância do catabolismo dos aminoácidos glicogênicos, como principal fonte de carbono para alimentar o ciclo de krebs e gerar poder redutor para maior tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. Entretanto, o papel do AMP não está muito claro. Acúmulo de AMP tem sido registrado em outro estudo, como resposta ao maior estresse por inibidores (DING et

passalidarum, visando aumentar a robustez para fermentação de hidrolisado lignocelulósico. Além disso, a *S. passalidarum* exibiu a capacidade de detoxificação de vários inibidores, mostrando potencial para aplicação biotecnológica, visando a produção de etanol de segunda geração.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; suporte financeiro do CNPq (455549/2014-1) e apoio do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)(CNPEM/MCTIC) no uso da instalação aberta [Metabolômica (MET) e Bioprocessos (BPC)].

Referências

- ABDELNUR, P. V; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. M. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 22, p. 1–9, 2014.
- ADEBOYE, P. T. et al. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 149, p. 1–14, 2015.
- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v. 4, n. 46, p. 1–10, 29 dez. 2014.
- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. ALD5, PAD1, ATF1 and ATF2 facilitate the catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ALMARIO, M. P.; REYES, L. H.; KAO, K. C. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2616–2623, out. 2013.
- ASK, M. et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 22, p. 1–13, 2013.
- BUHNER, J.; AGBLEVOR, F. A. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 13–30, 2004.
- CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2012.
- CANELAS, A. B. et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics.

Metabolomics, v. 4, n. 3, p. 226–239, 2008.

CARNEIRO, S.; PEREIRA, R.; ROCHA, I. Yeast metabolomics: sample preparation for a GC/MS-based analysis. In: MAPELLI, V. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2014. p. 197–207.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 486–494, 2 jul. 2018.

COLEMAN, S. T. et al. Expression of a Glutamate Decarboxylase Homologue Is Required for Normal Oxidative Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 244–250, 5 jan. 2001.

CRUTCHFIELD, C. A. et al. Mass Spectrometry-Based Metabolomics of Yeast. In: WEISSMAN, J.; GUTHRIE, C.; FINK, G. R. (Eds.). **Guide to yeast genetics: functional genomics, proteomics, and other systems analysis**. 2. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2010. p. 393–426.

DING, M.-Z. et al. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation. **Metabolomics**, v. 8, n. 2, p. 232–243, 2 abr. 2012.

DING, M. Z. et al. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **Omics**, v. 15, p. 647–653, 2011.

DING, M. Z.; ZHOU, X.; YUAN, Y. J. Metabolome profiling reveals adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* during repeated vacuum fermentations. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 42–55, 2010.

FERNANDES, S.; MURRAY, P. Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 6, p. 1–6, 2010.

FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547–554, 2011.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FITZGERALD, D. J. et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 104–113, 2004.

GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J.; RENAUD, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. **Yeast**, v. 13, n. 14, p. 1347–1356, 1997.

GUO, Z.; OLSSON, L. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 1234–1248, 2014.

HASUNUMA, T. et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2011.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205–214, 2012.

- HOU, X.; YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2591–2601, 2012.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1–10, 2013.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.
- LIMA, C. S. et al. Multiscale alterations in sugar cane cagasse and straw submitted to alkaline deacetylation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3796–3804, 2018.
- LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, 2011.
- LONG, T. M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, p. 5492–5500, 2012.
- MARTIEN, J. I.; AMADOR-NOGUEZ, D. Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 118–126, 2017.
- MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769–776, 2002.
- MORALES, P. et al. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 5–11, 2017.
- NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.
- NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232–1241, 2006.
- OVERKAMP, K. M. et al. Functional analysis of structural genes for NAD⁺-dependent formate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, n. 6, p. 509–520, abr. 2002.
- PALMA, M.; GUERREIRO, J. F.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 274, p. 1–16, 21 fev. 2018.
- PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 375–380, 1990.

- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.
- ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274–279, 2012.
- ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015.
- SÀNCHEZ NOGUÉ, V.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 761–772, 2015.
- SANTOS, S. C. et al. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 319–329, 2016.
- SCHROEDER, L.; IKUI, A. E. Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–16, 11 mar. 2019.
- SHUI, Z. X. et al. Adaptive laboratory evolution of ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5739–5748, 2015.
- WANG, X. et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 17, p. 150–159, 2013.
- WANG, X. et al. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 152–164, 2014.
- YURIMOTO, H.; OKU, M.; SAKAI, Y. Yeast Methylophony: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis. **International Journal of Microbiology**, p. 1–8, 2011.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese contribuiu com conhecimento sobre o contraste em nível químico e morfológico entre palha e bagaço de cana-de-açúcar, obtenção de hidrolisado fermentescível sem necessidade de etapa clássica de detoxificação e com fração de glucana mais digerível; bem como, a compreensão geral sobre a influência dos inibidores durante produção de bioetanol por *S. passalidarum*.

Quanto as modificações químicas e nanoestruturais após tratamento alcalino do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, percebe-se claramente maior susceptibilidade da palha de cana as condições alcalinas, sendo necessário mais otimizações das reações para uso dessa biomassa no processo combinado. A condição reacional ponto central (0,4 % m/v NaOH; 70 °C; 3 h) pode ser usado com o bagaço para estudos voltados ao aproveitamento da hemicelulose, celulose e lignina no contexto biorrefinaria, acoplado com pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído. Além disso, material sólido da palha e do bagaço de cana-de-açúcar foram caracterizados por FTIR, TCDV, SDV, DRX e por análise de composição química antes e após desacetilação alcalina com NaOH, mostrando-se como ferramentas úteis e sensíveis para a caracterização de outras biomassas. É imprescindível buscar meios para o aproveitamento do licor alcalino resultante da etapa de desacetilação, o qual é rico em vários compostos de importância industrial, como acetato, ácido *p*-cumárico e ferúlico, além de outros compostos. Na mesma linha de raciocínio, procedimentos que possibilitem o reciclo do hidróxido de sódio poderá reduzir os impactos ambientais decorrentes da adição da estratégia.

A sequencial aplicação do tratamento alcalino com posterior pré-tratamento em ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana resultou em hidrolisado fermentescível com baixa carga inibitória e sem necessidade de etapa clássica de detoxificação. Tal processo resultou no aumento da produção de etanol por *S. passalidarum*, sendo uma estratégia simples, prática e aplicável em larga escala. O hidrolisado rico em xilose obtido pela estratégia poderá ser usado para produção de diferentes compostos químicos dentro do contexto biorrefinaria (etanol, xilitol e ácido succínico, entre outros). É notável, também, observar que o material sólido (fração C6) gerado após aplicação da estratégia, tornou-se mais digerível pelas celulasas aumentando a porcentagem de conversão de glucana em glicose. Dessa forma, a adição da etapa de desacetilação aumenta a eficiência de hidrólise da glucana do bagaço de cana, podendo hipoteticamente reduzir os custos com enzimas na etapa de sacarificação. A

estratégia resultou em múltiplos benefícios, entretanto; é necessário análise tecno-econômica e ambiental de todas as etapas para estimar a viabilidade integral do processo.

Tendo em vista que a *S. passalidarum* mostrou-se extremamente sensível aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, foi realizado estudos com endometabolômica durante as 12 horas iniciais da fermentação, visando compreender a influência dos inibidores no metabolismo celular. Os dados indicaram drásticas mudanças no metabolismo dos aminoácidos e das purinas, redução de fluxo na via das pentoses, glicólise e menores níveis de intermediários do ciclo de krebs, como resposta celular aos múltiplos inibidores. Além disso, o catabolismo dos aminoácidos glicogênicos foi diagnosticado, como importante mecanismo celular associado a tolerância aos inibidores, o qual pode estar envolvido no maior fornecimento de intermediários para o ciclo de krebs e poder redutor na forma de NADH/NADPH para detoxificação de inibidores. Ademais, os inibidores promoveram uma resposta global no metabolismo de *S. passalidarum*, afetando a homeostase energética e balanço redox, traduzidos nos menores níveis de ATP e NADPH. Dessa forma, complexos mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a tolerância ao estresse por inibidores em *S. passalidarum* foram diagnosticados por LC-MS, fornecendo subsídios para aumentar a tolerância.

Embora representem apenas resultados preliminares, sugere-se para futuros trabalhos, otimização das condições de desacetilação com a palha de cana e uso no processo acoplado (palha desacetilada+pré-tratamento em ácido diluído), ensaios de hidrólise enzimática do bagaço desacetilado e pré-tratado em ácido diluído em alta proporção de sólido; desenvolvimento de estratégias para reciclo do hidróxido de sódio e utilização da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC) para avaliação econômico, ambiental e social do processo acoplado. Quanto a melhora na tolerância de *S. passalidarum* aos múltiplos inibidores, recomenda-se aumentar a expressão de enzimas relacionadas ao catabolismo de aminoácidos, especificamente os glicogênicos e desenvolvimento de estratégias para melhorar a disponibilidade de ATP e poder redutor (NADH/NADPH) na célula. Além disso, especula-se que a suplementação do hidrolisado lignocelulósico com aminoácidos glicogênicos pode resultar em melhor desempenho durante fermentação.

APÊNDICE A

Tabela 1 - Composição química (% , m/m) do bagaço de cana-de-açúcar após várias condições de desacetilação alcalina

	Rendimento	SB	Glucana	Xilana	Arabinana	Acetil	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Balanço
Bagaço bruto	100	0	39,53±0,54	22,88±0,75	1,98±0,07	2,76±0,09	28,52±1,07	23,18±1,31	1,29±0,09	94,49
BR1	93,25	6,74	36,27±0,02	21,54±0,03	2,09±0,01	1,80±0,04	26,21±0,06	22,12±0,83	1,37±0,11	92,22
BR2	85,28	14,71	37,83±1,54	21,21±0,82	2,40±0,08	0,13±0,03	24,46±0,94	17,05±0,64	1,35±0,12	94,65
BR3	91,20	8,79	35,55±0,00	20,13±0,00	2,02±0,00	1,68±0,00	25,41±0,00	22,52±0,00	1,92±0,12	94,65
BR4	78,30	21,69	38,24±0,00	19,00±0,00	2,09±0,00	0,02±0,00	22,39±0,00	12,55±0,00	1,29±0,00	95,13
BR5	93,83	6,16	37,25±2,75	21,22±1,52	2,14±0,17	1,74±0,16	26,52±2,00	23,15±0,68	1,17±0,00	93,92
BR6	82,54	17,45	37,96±2,41	20,13±1,13	2,30±0,12	0,06±0,02	23,49±1,29	16,06±1,24	1,33±0,12	95,56
BR7	89,14	10,85	35,01±1,57	20,39±0,87	2,03±0,09	1,61±0,08	25,22±0,95	21,28±0,23	1,36±0,12	93,01
BR8	75,79	24,20	40,24±0,00	19,51±0,00	2,17±0,00	0,02±0,02	22,82±0,00	10,46±0,00	1,21±0,00	98,63
Ponto central	87,69	12,30	39,63±0,35	22,18±0,33	2,44±0,06	0,27±0,08	26,21±0,50	18,74±0,30	1,05±0,31	97,66

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: **SB**, solubilização; **BR1**, 0,1 % NaOH/55 °C/1 h; **BR2**, 0,7 %

NaOH/55 °C/1 h; **BR3**, 0,1 % NaOH/85 °C/1 h; **BR4**, 0,7 % NaOH/55 °C/1 h; **BR5**, 0,1 % NaOH/55 °C/5 h; **BR6**, 0,7 % NaOH/55 °C/5 h; **BR7**, 0,1 % NaOH/85 °C/5 h; **BR8**, 0,7 % NaOH/85 °C/5 h; **Ponto central**, 0,4 % NaOH/75 °C/3 h.

APÊNDICE B

Tabela 2 - Composição química (% , m/m) da palha de cana-de-açúcar após várias condições de desacetilação alcalina

	Rendimento	SB	Glucana	Xilana	Arabinana	Acetil	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Balanco
Palha bruta	100,00	0,00	35,42±0,59	21,92±0,39	2,54±0,04	1,58±0,02	26,19±0,49	25,37±1,12	2,91±0,18	95,15
PR1	83,25	16,75	29,71±0,77	18,72±0,54	2,26±0,05	1,06±0,02	22,03±0,56	24,30±0,29	3,42±0,07	95,50
PR2	70,00	30,00	28,87±0,21	16,75±0,13	2,33±0,01	0,15±0,03	20,07±0,12	16,11±0,09	3,20±0,01	97,54
PR3	81,63	18,37	29,90±1,06	18,82±0,64	2,22±0,07	0,87±0,01	22,08±0,76	22,88±0,41	2,71±0,03	95,07
PR4	62,14	37,86	28,44±2,90	13,99±1,47	1,95±0,20	0,06±0,01	16,70±1,68	11,52±0,06	2,10±0,12	94,62
PR5	82,37	17,63	29,56±0,02	17,96±0,16	2,23±0,02	1,16±0,04	22,68±0,22	22,26±0,06	2,40±0,22	93,40
PR6	65,39	34,61	26,52±0,68	14,19±0,31	1,99±0,03	0,07±0,01	16,94±0,31	13,37±0,19	2,25±0,15	90,37
PR7	80,05	19,95	27,84±1,92	17,42±1,50	2,09±0,22	0,84±0,08	21,61±1,69	22,10±0,33	2,99±0,06	93,17
PR8	58,68	41,32	28,72±0,64	13,26±0,23	1,78±0,00	0,03±0,00	15,71±0,20	8,936±0,64	2,49±0,04	95,22
Ponto central	73,72	26,28	28,38±0,49	16,96±0,15	2,23±0,03	0,12±0,01	20,42±0,28	17,13±0,29	2,53±0,01	92,15

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: **SB**, solubilização; **PR1**, 0,1 % NaOH/55 °C/1 h; **PR2**, 0,7 % NaOH/55 °C/1 h; **PR3**, 0,1 % NaOH/85 °C/1 h; **PR4**, 0,7 % NaOH/55 °C/1 h; **PR5**, 0,1 % NaOH/55 °C/5 h; **PR6**, 0,7 % NaOH/55 °C/5 h; **PR7**, 0,1 % NaOH/85 °C/5 h; **PR8**, 0,7% NaOH/85 °C/5 h; **Ponto central**, 0,4 % NaOH/75 °C/3 h.

Multiscale Alterations in Sugar Cane Bagasse and Straw Submitted to Alkaline Deacetylation

Cleilton S. Lima,^{†,‡} Sarita C. Rabelo,[†] Peter N. Ciesielski,[§] Inês C. Roberto,[‡] George J. M. Rocha,[‡] and Carlos Driemeier^{*,†,§}

[†]Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

[‡]Department of Biotechnology, Engineering College of Lorena, University of São Paulo, 12602-810 Lorena, São Paulo, Brazil

[§]Biosciences Center, National Renewable Energy Laboratory, 15013 Denver West Parkway, Golden, Colorado 80401, United States

ABSTRACT: Alkaline deacetylation has emerged as a promising chemistry for pretreatments performed prior to enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. This process avoids complex pressurized reactors and opens new opportunities for lignin covalorization. In this work, we evaluate the chemical and morphological response of sugar cane bagasse and straw submitted to alkaline treatments. Alkaline solutions for deacetylation (0.4% w/w NaOH, 70 °C, 3 h) as well as proximal conditions (0.1–0.7% NaOH, 55–85 °C, 1–5 h) chosen by 2³ experimental design were evaluated. The deacetylation treatment removes ~90% of the acetyl groups and 20–30% of the lignin from both bagasse and straw, while removal of ~20% of the xylan and glucan is observed in straw, but not in bagasse. Considering nanoscale structural alterations, neither cellulose cocrystallization (evaluated by X-ray diffraction) nor formation of lignin aggregates (evaluated by thermoporometric signature) are observed after the alkaline conditions, in contrast to observations after hydrothermal treatments. Furthermore, calorimetric thermoporometry as well as scanning and transmission electron microscopies show substantial introduction of nanoscale porosity and loosening of the tissue and cell wall structures, indicating desirable mechanical weakening and gains in enzyme accessibility. These results provide fundamental and practical knowledge for biorefineries based on alkaline deacetylation of sugar cane bagasse and straw.

KEYWORDS: Deacetylation, Pretreatment, Sugar cane, Bagasse, Straw

INTRODUCTION

Lignocellulosic biomass is a vast, inexpensive renewable resource with potential to replace a sizable share of the global demand for fossil fuels.^{1,2} Sugar cane is especially well positioned because of its high productivity and consolidated bioenergy system, especially in Brazil.^{3,4} Historically, the main products of sugar cane have been derived from the soluble sugars of the juice. These sugars make roughly 1/3 of the above-ground plant dry matter; the other 2/3 are lignocellulosic residues: the bagasse and the straw. Bagasse is the fibrous residue left after crushing the stalks for extraction of the juice.^{3,4} It is used in the mill as fuel for heat and power, but a large share can be made available for further valorization.^{5,6} Straw is composed of the green tops and the dry leaves of sugar cane. Part of the straw must remain on the field for nutrient recycling and soil protection, while part can be collected and transported to the mill.⁷ Hence, both bagasse and straw are lignocellulosic feedstocks available for conversion into biofuels and biochemicals.⁶

In advanced biorefineries, lignocellulosic biomass is converted into a range of products, having liquid biofuels such as cellulosic ethanol as the high-volume output. Biomass pretreatment is the first critical step^{8,9} and constrains all the

downstream processes. At present, there are several pioneer commercial facilities producing cellulosic ethanol worldwide.^{10,11} Most of these pioneer facilities employ either dilute acid or steam explosion pretreatments.^{9–11} This class of pretreatments exposes biomass to aqueous, acidic environments at high pressure and temperature (~140–200 °C). In recognition that such treatments (with or without acid catalyst) may have a continuous range of pH and promote common morphological changes to the biomass,¹² they are here generally termed hydrothermal pretreatments. This class of pretreatments preferentially hydrolyze and solubilize the hemicelluloses and are effective in opening the biomass structure, reducing the recalcitrance.^{13,14}

Since hydrothermal pretreatments are already employed at commercial scale, the advantages and disadvantages of the processes have been clearly diagnosed and thereby provide a benchmark for new concepts. Disadvantages of hydrothermal processes include the generation of inhibitory compounds toxic for fermentation,^{15,16} chemical condensation of lignin, which

Received: November 9, 2017

Revised: December 13, 2017

impedes its conversion into high-value chemicals,^{17,18} and high temperature introduction of the morphological cohesive phenomena of cellulose cocrystallization^{12,19,20} and lignin aggregation.^{12,21–23} Furthermore, due to the acidity of the medium and abrasiveness of the feedstock, industrial-scale pressurized reactors for biomass pretreatment are complex and costly, and feeding biomass into pressurized reactors has proven to be nontrivial.²⁴ Indeed, the experience of the pioneer cellulosic ethanol facilities has been indicating these reactor issues are the major challenge for biorefineries based on hydrothermal pretreatments.^{9,10}

Alkaline deacetylation has emerged as a promising alternative pretreatment process. Deacetylation removes most of the biomass acetyl groups and a relatively small fraction of the lignin, hence differing from harsher alkaline conditions that promote extensive delignification.²⁵ Deacetylation was initially introduced as a step prior to dilute acid pretreatment of corn stover.²⁶ Later, deacetylation was shown to be effective as the single chemical step followed by mechanical refining. These routes were named deacetylation and disk refining (DDR) or deacetylation and mechanical refining (DMR).^{27–29} DDR/DMR routes overcome the major limitations of the hydrothermal pretreatments. Deacetylation can be performed in relatively inexpensive atmospheric tanks, thus avoiding the complexity and costs associated with pressurized reactors. In addition, sugars remain as polysaccharides in the deacetylated solid, which is washed out and set free from fermentation inhibitors. Finally, native lignin chemistry is less perturbed by the mild alkali and, therefore, deacetylation routes offer promising prospects for covalorization of lignin.¹⁸

In this work, we investigate how sugar cane bagasse and straw respond to dilute alkali chemistries. Our effort thus stands at the convergence of a promising pretreatment chemistry (alkaline deacetylation) and a well established bioenergy crop (sugar cane) with its associated lignocellulosic residues (bagasse and straw). Furthermore, while previous deacetylation studies focused on process development for corn stover,^{26–29} this work provides a fundamental investigation on how deacetylation alters the biomass multiscale structure, from molecular to tissue scales. Changes in biomass composition and multiscale architecture are comprehensively investigated, providing fundamental and practical insights for biorefineries based on alkaline deacetylation of sugar cane bagasse and straw.

MATERIALS AND METHODS

Biomass. Sugar cane bagasse was collected from the conveyor belt of Pedra Agroindustrial mill, Serrana, SP, Brazil. Sugar cane straw was sampled from a bale obtained at a farm near Campinas, SP, Brazil. Prior to experimental use, straw was manually chopped for size reduction of the larger particles. Bagasse and straw were dried at room temperature and humidity (reaching ~10% moisture content) and then stored.

Alkaline Treatments. The reference condition of alkaline treatment (0.4% w/w NaOH, 70 °C, 3 h) was chosen based on previous optimization for deacetylation of corn stover.²⁶ We henceforth refer to this condition as deacetylation (de-Ac). Conditions were varied following a factorial 2³ experimental design, having the deacetylation condition as the central point performed in triplicate. In the experimental design, [NaOH]¹ (0.1, 0.4 and 0.7% w/w), temperature (55, 70 and 85 °C) and time (1, 3 and 5 h) were varied.

Alkaline treatments were performed with 25 g of native biomass in a 0.5 L batch reactor where 300 mL of the alkaline solution was added, generating a solid–liquid ratio of 1:12 (g/mL), as employed for corn stover.²⁶ The reactor was heated in a glycerin thermostatic bath during the reaction residence time and then cooled down for 10 min in an ice

bath. The content of the reactor was poured into a polypropylene mash for filtration. The solid fraction was exhaustively washed with tap water to remove soluble residues. Feedstocks were used as described (Biomass section) and the treated solids were employed to obtain reaction yield, solid chemical composition, Fourier-transform infrared (FTIR) spectra, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) images. Alternatively, the native biomass was ground in a Pulverisette 14 mill (Fritsch, Germany) with 0.2 mm control sieve. The ground biomass was submitted to three treatment conditions of variable alkali concentrations: 0.1% NaOH; 55 °C; 1 h; 0.4% NaOH; 70 °C; 3 h (de-Ac); and 0.7% NaOH; 55 °C; 1 h. The solids generated by these conditions were finer particulates better for sampling and they were analyzed by X-ray diffraction, (XRD), dynamic vapor sorption (DVS) and calorimetric thermoporometry (CTP).

Determination of Percentage Solubilization. Sample dry mass was determined by weighting the wet sample and subtracting the moisture content determined from a separated aliquot using an automatic infrared moisture analyzer MA35 (Sartorius GmbH, Germany). This procedure was applied to the biomass input as well as to the washed solids after the alkaline treatments. The dry matter difference between input and output is expressed as percentage solubilization.

Biomass Composition. Ash contents were determined gravimetrically by biomass calcination.³⁰ Extractive contents in native bagasse and straw were determined by extraction at reflux for 24 h in a Soxhlet apparatus using cyclohexane–ethanol 1:1 (v/v) followed by water. The extracted samples were submitted to two-step analytical acid hydrolysis followed by filtration. The filtrate was used to determine the concentrations of sugars, organic acids and furanic aldehydes (furfural and hydroxymethyl-furfural, HMF) using high-performance liquid chromatography (HPLC). Sugars (glucose, cellobiose, xylose and arabinose) and organic acids (formic, levulinic and acetic acids) were analyzed using a HPLC system 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, USA) equipped with refractive index (RI) detector. The analytical Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm, 5 μm) was used in combination with a guard column Micro-Guard Cation PC H Refill Cartridges (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The mobile phase was sulfuric acid (5 mmol/L) at flow rate of 0.6 mL/min. For furfural and HMF analyses, a reversed-phase HPLC equipped with an Acclaim 120 C18 column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) and a single wavelength UV detector were used. The mobile phase was water–acetonitrile 1:8 (v/v) with 1% acetic acid (v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. Soluble lignin in the filtrate was quantified by spectrophotometry at 280 nm with liquor adjusted to pH 12. Insoluble lignin was gravimetrically determined as the solid residue from hydrolysis with subtraction of ash content determined by calcination. Total lignin is the sum of the soluble and the insoluble fractions. Concentrations of glucose, cellobiose, HMF, formic and levulinic acids were converted to glucan content. Concentrations of xylose, arabinose and acetic acid were converted to contents of xylan, arabinan and acetyl groups, respectively. Summation of these components and the concentration of furfural were used to calculate the content of hemicelluloses.³¹

Infrared Spectroscopy. Air-dried samples were ground with the Pulverisette 14 mill (Fritsch, Germany) with 0.08 mm control sieve (Note: alkali treated samples were ground after the treatments). The resulting particulates were analyzed in triplicates employing an FTIR Frontier spectrometer (PerkinElmer, United States) with attenuated total reflectance (ATR) accessory with diamond-covered zinc selenide crystal. FTIR spectra were collected in the 600–4000 cm^{−1} range, with 4 cm^{−1} resolution, 1 cm^{−1} recording intervals and 16 scans per spectrum.

X-ray Diffraction. Air-dried samples were conditioned in special glass capillary tubes (Ø = 2 mm, Charles Supper Company). Cu Kα radiation (λ = 1.5418 Å) was generated by a Rigaku ultraX-18HF rotating anode with VariMax HR monochromating optics. X-ray incidence was orthogonal to the capillary tubes, and the diffraction patterns were collected by a mar345 image plate (Marresearch GmbH, Germany) with 150 μm pixel size positioned 120 mm behind the

sample tubes. Exposure times of 6 min were employed, with the capillary tube rotating 360° around its axis during the exposure. The two-dimensional XRD patterns were calibrated, corrected and analyzed by the model Cellulose Rietveld Analysis for Fine Structure (CRAFS),³² using the peak-shape parameters described previously.¹⁹ CRAFS is a parametric model that fits calculated diffraction patterns to the experimental ones. Among the determined parameters, the crystal width L_{200} is especially important because it is precisely determined from the width of the prominent (200) diffraction peak. Essentially, CRAFS analysis of L_{200} applies the Scherrer equation with correction for instrumental peak broadening.³²

Dynamic Vapor Sorption. DVS was performed at 50 °C in a Q5000 SA instrument (TA Instruments, United States) using metalized quartz pans. The starting samples were wet and were submitted to sequential steps of decreasing (desorption) and then increasing (sorption) relative humidity. The water mass recorded at the end of each relative humidity step was used to construct desorption and sorption isotherms,³³ which were fitted with the Hailwood–Horrobin (HH) model.^{34,35} Three parameters were determined from each modeled isotherm: monolayer hydration m_0 , free energy change of monolayer water ΔG_h , and free energy change of dissolved water ΔG_d .

Calorimetric Thermoporometry. CTP was performed in a differential scanning calorimeter Q200 with autosampler (TA Instruments, United States) following laboratory and data analysis procedures.^{33,36} Water-saturated samples were initially frozen at −70 °C. By controllably ramping the temperature, CTP detects the so-called Freezing Bound Water (FBW), measured from ice melting below 0 °C. From the temperature depression of ice melting ΔT , one calculates the diameter $d = -2 K_c / \Delta T$ of water-filled pores, with $K_c = 19.8$ nm K. In addition, from the magnitude of the heat signal, one calculates the mass of water associated with each pore diameter. The CTP result is a cumulative distribution of FBW in units of $g_{\text{water}}/g_{\text{solid}}$ as a function of pore diameter in the ~1–200 nm range.

Scanning Electron Microscopy. Hydrated samples were frozen and mailed from CTBE to NREL for electron microscopy studies. Hydrated particles were hand sectioned and freeze-dried to prevent dehydration artifacts. Sections were positioned onto double-stick carbon tape and mounted on aluminum stubs and sputter coated with 5 nm of iridium. SEM imaging was performed using a FEI Quanta 400 FEG with an accelerating voltage of 10 keV.

Transmission Electron Microscopy. Hydrated samples were first prepared for ultramicrotomy using a microwave assisted chemical dehydration and resin infiltration procedure. The samples were dehydrated in 4 steps with increasing concentrations of ethanol. Next, the microwave assisted resin exchange procedure was performed using 4 steps with increasing LR White Medium grade Resin (Ted Pella, Inc.) and infiltrated with 1 min intermittent microwave steps. Following the microwave procedure, the samples were left at room temperature overnight in 100% resin prior to polymerization. The samples were then transferred to flat-bottomed capsules and polymerized at 60 °C overnight under a nitrogen environment. Embedded samples were sectioned to ~100 nm with a Diatome diamond knife (Diatome, Hatfield, PA) on a Leica EM UTC ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were collected on 0.5% Formvar coated copper slot grids (SPI Supplies, West Chester, PA). Grids were poststained for 30 s with 1% aqueous KMnO_4 . Images were captured with a four mega-pixel Gatan UltraScan 1000 camera (Gatan, Pleasanton, CA) on a FEI Tecnai G2 20 Twin 200 kV LaB6 TEM (FEI, Hillsboro, OR).

RESULTS

Biomass Solubilization by the Alkaline Treatments.

The deacetylation condition solubilizes 12.3% of the sugar cane bagasse and 26.3% of the sugar cane straw (Table 1), while for corn stover the reported solubilization was roughly 20%.²⁶ The higher susceptibility of straw compared to bagasse is observed in all the evaluated conditions (Table 1). The relative importance of the treatment factors (%NaOH, temperature

Table 1. Treatment Conditions Chosen by Factorial Experimental Design and Percentage Solubilization Determined Gravimetrically^a

Conditions (%NaOH; °C; h)	Bagasse solubilization (%)	Straw solubilization (%)
^b 0.1; 55; 1	6.7	16.8
0.1; 55; 5	6.2	17.6
0.1; 85; 1	8.8	18.4
0.1; 85; 5	10.9	20.0
^b 0.4; 70; 3	12.3 ± 0.6	26.3 ± 0.2
^b 0.7; 55; 1	14.7	30.0
0.7; 55; 5	17.5	34.6
0.7; 85; 1	21.7	37.9
0.7; 85; 5	24.2	41.3

^aStandard deviation of triplicates is shown for the deacetylation condition (0.4% NaOH, 70 °C, 3 h), which is the central point of the factorial design. The additional conditions were created by independent variations in [NaOH] (0.1 and 0.7%), temperature (55 and 85 °C) and time (1 and 5 h). ^bConditions used for the studies with X-ray diffraction, dynamic vapor sorption and calorimetric thermoporometry. The chosen conditions vary the %NaOH, which is the dominant factor influencing solubilization.

and time) can be inferred from Table 1, which sorts the alkaline conditions in ascending order of solubilization (except for the two milder conditions whose difference for bagasse, 6.7 and 6.2%, is considered insignificant). The sorting of data in Table 1 makes clear the three experimental factors increase solubilization and, for the evaluated conditions, their relative importance is ranked as %NaOH > temperature > time.

Identification of the Solubilized Components. FTIR was employed to obtain qualitative chemical information about the solubilized components. Compared to the native bagasse and straw, the deacetylated samples show important absorbance reduction at 1240 and 1730 cm^{-1} (Figure 1). These bands are

Figure 1. Infrared spectra of native and deacetylated sugar cane bagasse and straw. Flat baseline was subtracted and intensity was normalized by the maxima in the carbohydrate fingerprint region (see inset).

consistent respectively with C—O and C=O bonds of cell wall esters, including the O-acetyl groups.³⁷ The absorbance reductions are therefore consistent with breakage of esters as main reactions promoted by the alkaline treatment. Noteworthy, absorbance reductions are also observed in other spectral regions such as the 1510 cm^{-1} band associated with aromatic skeletal vibrations, and hence consistent with partial removal of lignin. In addition, native straw shows the highest

Table 2. Composition of Native and Deacetylated (de-Ac) Sugar Cane Bagasse and Straw Given As Percentage of Dry Matter^a

Sugar cane fraction	State	Glucan	Xylan	Arabinan	Acetyl	Hemicellulose	Lignin	Ashes	Extractives	Mass closure
Bagasse	native	39.5 ± 0.5	22.9 ± 0.8	2.0 ± 0.1	2.76 ± 0.09	28.5 ± 1.1	23.2 ± 1.3	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.2	94.5
	de-Ac	45.2 ± 0.4	25.3 ± 0.3	2.8 ± 0.1	0.30 ± 0.08	29.9 ± 0.5	21.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3	—	97.7
	de-Ac (% native)	39.6 ± 0.4	22.2 ± 0.3	2.4 ± 0.1	0.27 ± 0.08	26.2 ± 0.5	18.7 ± 0.3	1.1 ± 0.3	—	—
Straw	native	35.4 ± 0.6	21.9 ± 0.4	2.5 ± 0.1	1.58 ± 0.02	26.2 ± 0.5	25.4 ± 1.1	2.9 ± 0.2	5.3 ± 0.3	95.2
	de-Ac	38.5 ± 0.5	23.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	0.16 ± 0.01	27.7 ± 0.3	23.2 ± 0.3	3.4 ± 0.1	—	92.8
	de-Ac (% native)	28.4 ± 0.5	17.0 ± 0.2	2.2 ± 0.1	0.12 ± 0.01	20.4 ± 0.3	17.1 ± 0.3	2.5 ± 0.1	—	—

^aThe deacetylated solids are also presented as percentage of native dry matter; which corrects for the removal of 12.3% (bagasse) and 26.3% (straw) in the deacetylation process.

absorbance at a broad spectral region from 1300 to 1700 cm⁻¹, where vibration modes such as C—H bending and C=C stretch are expected.³⁷ The alkaline treatment reduces the absorbance in this broad band and the resulting spectrum from the deacetylated straw is similar to the deacetylated bagasse. This result reveals that native straw has a broad range of chemical components that are solubilized under the deacetylation conditions, corroborating the data of biomass solubilization (Table 1).

More specific and detailed chemical information is obtained by biomass composition analysis. Table 2 shows that the deacetylation treatment removes bagasse extractives, most of acetyl groups (2.76% → 0.27%), and a fraction of lignin (23.2% → 18.7%), numbers similar to those observed for corn stover.^{29,38} On the other hand, glucan, xylan, arabinan and ash contents of bagasse do not appear significantly altered as percentage of native dry matter (Table 2). Noteworthy, contrasting with our results, previous studies reported reduction of ash contents after deacetylation,^{39,40} suggesting dependence on the type of the minerals present in the biomass. It is also important to note that the preservation of components differs in sugar cane straw. In addition to removal of extractives, most of acetyl groups (1.58% → 0.12%), and a fraction of lignin (25.4% → 17.1%), straw also presents significant loss of glucan (35.4% → 28.4%) and xylan (21.9% → 17.0%). Only contents of ash and arabinan appear to be unaltered by straw deacetylation. These data demonstrate general agreement with the FTIR spectra in that the composition analysis shows straw has a range of chemical components more susceptible to the alkaline treatments.

Additional insight is obtained by evaluating biomass composition across all the applied alkaline treatment conditions (listed in Table 1). In Figure 2, all contents are given as percentage of treated dry matter (left-hand column of Figure 2) as well as percentage of native dry matter (right-hand column of Figure 2), which informs directly whether component removal occurred. We can identify trends of component preservation or loss as a function of solubilization, with dispersion of data points offering a visual estimate for the uncertainty in the data. With this perspective, for both bagasse and straw, we can infer that ash contents are preserved under alkaline treatments, while lignin is progressively removed as treatment severity increases. Most acetyl groups are removed after 0.4% or 0.7% NaOH treatments, while 0.1% NaOH removes only a small fraction of the acetyl groups, evidencing [NaOH] has a key role in the extent of the deacetylation reaction. Arabinan in bagasse is preserved across all treatment severities, while arabinan in straw is lost at higher severities. For bagasse and straw, xylan is progressively removed as severity

Figure 2. Composition of native and treated sugar cane bagasse and straw. The graphs show composition as percentage of treated (left-hand side) and native (right-hand side) dry matter plotted against the biomass percentage solubilized by the NaOH treatments (Table 1).

increases, with xylan solubilization being more expressive in straw than in bagasse. Bagasse glucan is preserved across all treatment severities. On the other hand, part of the glucan from straw is lost under the mildest treatment conditions, but no additional glucan loss is observed at more severe alkali. This latter result evidences some sort of weakly bound glucan present in native sugar cane straw.

Absence of Cellulose Cococrystallization. Cellulose cococrystallization has been observed in several high-temperature processes of lignocellulosic biomass, such as hydrothermal

treatments^{12,19} and wood chemical pulping.⁴¹ Cellulose cocrystallization is observed as an increase in the mean width of cellulose crystallites. Molecular dynamic simulation¹² and thermodynamic calculations²⁰ have indicated that cocrystallization results from the fusion of laterally adjacent cellulose crystallites. A common way of observing cocrystallization is through the sharpening of the X-ray diffraction peaks associated with the lateral dimensions L of the cellulose crystallites, especially in the most prominent (200) diffraction peak.^{19,41}

Comparison of the diffractograms of native and deacetylated bagasse reveals that sharpening is present, but only to very small extent (Figure 3a). CRAFS analysis shows slight gains in

Figure 3. X-ray diffraction of native and NaOH treated biomass. (left) Diffractograms of native and deacetylated bagasse, after background subtraction and normalization of peak area. (right) Crystallite width L_{200} obtained from the Cellulose Rietveld Analysis for Fine Structure (CRAFS) model for native (0% solubilization) and NaOH treated bagasse (blue squares) and straw (red circles). Increasing L_{200} due to liquid hot water (160–190 °C) treatments of sugar cane bagasse (black triangles, data from ref 19) is shown for comparison.

crystal width L_{200} for both bagasse and straw submitted to 0.1, 0.4 and 0.7% NaOH. The observed gains in L_{200} (up to ~0.3 nm) are greater than experimental precision (~0.1 nm) and this observation could be a qualitative indication of cellulose cocrystallization. However, the magnitude of the change is too small to be conclusive. A previous study estimated that up to ~10% gains (~0.3 nm) in L_{200} may be explained by other diffraction line-broadening contributions such as crystal micro-strain.¹⁹ Hence, we conclude the alkaline treatments cause no significant cellulose cocrystallization, making the remark that the uncertainty comes from the interpretation and not from the analysis of the experimental data.

Altered Hydration. The native and the deacetylated states of bagasse (Figure 4a) and straw (Figure 4b) show very similar moisture sorption isotherms, which can only be visually discriminated in the difference plots (Figure 4c). By fitting the desorption and sorption isotherms with the HH model,^{34,35} the obtained parameters m_0 , ΔG_h and ΔG_d reveal consistent trends as a function of alkaline severity (Figure 4d–f). Monolayer hydration m_0 is quite stable (Figure 4d), which in part can be explained by the stability of cellulose crystallite width L_{200} (Figure 3).⁴² The free energy of monolayer hydration ΔG_h has negative values (–200 to –250 J/g) that reflect the hydrophilicity of the matrix.^{33,35} ΔG_h decreases with alkaline severity (Figure 4e), consistent with removal of hydrophobic groups such as acetyls, making the biomass water-accessible surfaces more hydrophilic. Free energy of the so-called dissolved water ΔG_d has positive values (40–49 J/g) reflecting matrix opposition to the swelling associated with

Figure 4. Moisture sorption isotherms of native and deacetylated (a) bagasse and (b) straw, showing experimental data (symbols) and fit with the Hailwood-Horrobin (HH) model (lines). (c) Difference isotherms (deacetylated minus native) of bagasse and straw. The HH model parameters obtained by fitting sorption and desorption isotherms of native and treated (0.1, 0.4 and 0.7% NaOH) biomass. (d) Monolayer hydration m_0 . (e) Free energy change of monolayer water ΔG_h . (f) Free energy change of dissolved water ΔG_d .

water uptake.³³ ΔG_d also decreases with alkaline severity, and we speculate the water uptake is eased by gains in nanoscale porosity, which will be later verified by CTP. The trends of Figure 4e,f are only broken by native straw, which is a quite different material when one considers the diversity of compounds removed in alkali, as evidenced by FTIR (Figure 1) and composition analysis (Table 2 and Figure 2).

Opening of Nanoscale Pores. A primary role of pretreatments is to open nanoscale pores in the biomass structure, which increase the accessibility of the cell walls to enzymes.^{43,44} Our CTP results demonstrate the deacetylation treatments successfully increased the nanoscale porosity of bagasse (Figure 5a) and straw (Figure 5b). Noteworthy, the FBW gains are observed at pore diameters of ~10 nm or greater. By analyzing FBW specifically at the 10–200 nm range, one observes insignificant gain at the lowest solubilization (0.1% NaOH treatment), indicating a certain threshold of alkaline severity is necessary to start the gains of nanoscale porosity. The deacetylation condition is beyond this threshold. By comparing bagasse treated in alkali and in liquid hot water (160–190 °C, samples of ref 19) having percentage solubilization as a control variable, it is noteworthy that higher values of FBW 10–200 nm are observed after alkali. This result evidences that alkali treatments can be more selective than hydrothermal treatments at opening biomass nanoscale pores, at least for the case of liquid hot water processes without mechanical action on the biomass.

Absence of Lignin Aggregates. Another nanoscale cohesive phenomenon induced by hydrothermal conditions is the formation of lignin aggregates.^{12,21,22} It has been shown that such aggregates contribute to a characteristic thermoporometric

Figure 5. Freezing Bound Water (FBW) profiles of native and deacetylated (a) bagasse and (b) straw. (c) FBW profiles of a different sugar cane bagasse submitted to liquid hot water treatments (160–190 °C, samples of ref 19) reaching various percentages of solubilization. The orange arrow indicates FBW gains in a range of pore diameter (<4 nm) attributed to water pockets in lignin aggregates, which do not appear after deacetylation (a,b). (d) FBW gains in the range of 10–200 nm pore diameter after NaOH treatments of bagasse (blue squares) and straw (red circles) are compared to hydrothermal treatments of bagasse (black triangles, samples of ref 19).

signal (FBW) at pore sizes below ~4 nm (see arrow in Figure 5c), which was attributed to water pockets associated with surface irregularities of the lignin aggregates.²³ This thermoporometric signature is absent after alkaline reactions (Figure 5a,b), indicating absence of lignin aggregates in the alkali-treated biomass.

Visualization of Tissues and Cell Walls. Structural modifications that occurred within the biomass resulting from the deacetylation treatment were investigated at the tissue scale and cell wall ultrastructure scale by SEM and TEM. SEM micrographs obtained from particle cross sections are presented in Figure 6. The general morphology of the vascular tissue of

Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) of native and deacetylated vascular tissue from bagasse and straw particles. Cross sections of untreated bagasse (top left) and straw (bottom left) particles show largely intact cell walls. Deacetylated bagasse (top right) and straw (bottom right) display evidence of mechanical weakening, as well as localized regions of severe cell wall disruption. White arrowheads indicate obvious examples of cell wall delamination; white squares denote regions of relatively mild deconstruction; white ovals indicate regions of severe deconstruction.

native bagasse and straw particles appear similar, though the cell walls in the bagasse particles were notably thicker. Following deacetylation, both bagasse and straw vascular tissue exhibit evidence of reduced mechanical integrity. This is observed as deformation of cell wall structure relative to the native samples, as well as obvious delamination of the various layers of the cell wall (identified by white arrowheads in the top

right and bottom right panels of Figure 6). The SEM images of the deacetylated material also highlight the heterogeneous nature of cell wall deconstruction observed across these samples. In both deacetylated samples, some cell walls appear relatively intact, exhibiting only mild deconstruction (examples of this are shown in white rectangles in top right and bottom right panels of Figure 6). In contrast, the cell walls in other regions appear severely deconstructed (exemplary regions are shown in white ovals in the top right and bottom right panels of Figure 6). Interestingly, such instances of mild deconstruction and severe deconstruction are both observed in secondary walls of similar tissue types in relatively close proximity.

TEM micrographs from the vascular tissue of native and deacetylated bagasse particles (Figure 7) provide additional

Figure 7. Transmission electron microscopy (TEM) of native and deacetylated secondary cell walls from vascular tissue of bagasse particles. Compared to untreated material (left), images of deacetylated cell walls displayed a marked difference in the darkness and contrast in response to chemical staining, even in instances where structural disruption was extremely mild (middle). However, some regions displayed relatively severe deconstruction, mainly in the form of delamination of the cell wall layers (right).

information about the impact of deacetylation at the scale of cell wall ultrastructure. Deacetylation had a noticeable effect on all cell walls at this scale. Even regions where structural deformation was very mild (middle panel of Figure 7), a notable difference in the contrast resulting from chemical staining with KMnO_4 was observed relative to the native cell walls which appear darker with less contrast between the various layers of the walls, which is indicative of chemical modification of the cell wall material. This observation is consistent with the FTIR and compositional analyses presented for these samples which indicated range of chemical components present within the cell wall are affected by deacetylation. Furthermore, some regions were extensively deconstructed, an example of which is shown in the right panel

of Figure 7. As for the spatial heterogeneity in deconstruction, we speculate it may arise from the formation of localized intraparticle regions that were mechanically weakened and thus more susceptible to the chemical treatment⁴⁵ and/or limitations in intraparticle transport phenomena that restrict the NaOH access to certain regions of the particles during deacetylation.

In addition, these images of deacetylated bagasse and straw display evidence of mechanical weakening with respect to the native materials. The cell wall surfaces exposed after cleaving the particle appear generally more deformed relative to the corresponding surfaces of native biomass, which suggests an overall weakening of the mechanical integrity of the deacetylated material. This assertion is consistent with previous reports that deacetylation reduces the energy inputs required for adequate size reduction by mechanical refining.²⁹ Furthermore, some regions displayed relatively severe deconstruction, mainly in the form of delamination of the cell wall layers. Delamination and general loosening of the cell wall tissue observed in the deacetylated samples will serve to enhance the accessibility of the carbohydrate to enzymes during saccharification.^{43,44}

DISCUSSION

Contrast between Bagasse and Straw. The contrasts between bagasse and straw can be explained by the differences in the plant tissues as well as in their processing history. In previous studies, straw was shown more susceptible (less recalcitrant) than bagasse in a range of conditions, including hydrothermal and alkaline treatments as well as enzymatic saccharification.^{46–48} Similar tissue-specific behavior has been observed in grasses other than sugar cane.⁴⁹ As for the differences in processing history, bagasse is the residue of sugar cane crushing for juice extraction at $\sim 70^\circ\text{C}$.⁴ Therefore, native bagasse was already extracted in warm water, which is not the case of straw. For biorefineries based on alkaline deacetylation, the removal of $\sim 20\%$ of the glucan and xylan (Table 2) from native straw deserves special consideration. In the DDR/DMR routes,^{27–29} downstream sugar valorization (e.g., by fermentation to ethanol) uses the sugars preserved as polysaccharides in the deacetylated solids. Hence, the glucan and xylan solubilized from sugar cane straw will require separate valorization processes, perhaps increasing costs and complexity. This would be a disadvantage for using straw as the feedstock of alkaline deacetylation biorefineries.

Relations between Chemical and Morphological Alterations. Chemical and morphological changes co-occur during biomass treatments and it is important to understand the relations between the chemical and the morphological dimensions. Studies of cellulose cocrystallization indicate this phenomenon depends on lignin and hemicelluloses removal (hence creating direct contacts between adjacent cellulose crystallites) and high-temperature (which dehydrates intercrystallite regions).^{12,19,50} In alkaline deacetylation, component removal and temperature ($55\text{--}85^\circ\text{C}$) are moderate. Hence, the cellulose cocrystallization conditions are weakly present and the phenomenon is not observed (Figure 3).

As for changes in hydration, the trend of increasing hydrophilicity (decreasing ΔG_h) of the water-interacting surfaces (Figure 4e) is in line with the preferential removal of hydrophobic components, namely extractives, lignin and acetyl groups (Table 2 and Figure 2). Acetyl decorations in hemicelluloses are thought to help keeping the structural

integrity of cell walls by creating hydrophobic contacts where lignin noncovalently binds to hemicelluloses.⁵¹ Hence, by eliminating this type of binding, deacetylation impairs the wall structural integrity. In addition, ferulic and *p*-coumaric acids are ester bonded to hemicelluloses and occasionally ester or ether bonded to lignin.^{52–56} The ester bonds are presumably broken by the alkali and, thus, the breakage of the ferulic and *p*-coumaric bridges between hemicelluloses and lignin would be another channel contributing to the overall mechanical weakening, wall delamination and opening of nanoscale pores observed in deacetylated bagasse and straw (Figures 5–7).

Alkaline Deacetylation Compared to Acidic Hydrothermal Pretreatments. Since most pioneer cellulosic ethanol plants employ acidic hydrothermal pretreatments, and alkaline deacetylation offers a substitute pretreatment chemistry, it is worth comparing the two approaches. Acidic hydrothermal treatments preferentially hydrolyze and solubilize the hemicelluloses. However, extractives, fragments of lignin and acetyl groups are solubilized together and furfural is formed especially when acid catalyst is added. Therefore, the solubilized sugars are inherently mixed with a range of inhibitory compounds toxic for fermentation.^{15,16} In alkaline deacetylation routes, sugars remain in the washed solids free of inhibitory compounds, which is advantageous. On the other hand, the alkaline liquor will require novel strategies for alkali recovery and valorization of its organic constituents, all integrated in the biorefinery concept.

Another point worthy of comparison is the induction of nanoscale cohesive phenomena. In hydrothermal treatments, the cohesive phenomena of cellulose cocrystallization^{12,19,20} and lignin aggregation^{12,21–23} are observed and they are in part consequences of high temperatures. However, cohesive phenomena are contrary to the primary objective of pretreatments, which is to open the biomass structure.^{43–45} Therefore, the lack of cellulose cocrystallization (Figure 3) and lignin aggregation (thermoporometric signature at Figure 5) can be considered advantages of alkaline deacetylation compared to hydrothermal pretreatments.

Looking to the desired opening of the biomass structure, at a first glance the delamination of the cell walls after alkaline deacetylation (Figures 6 and 7) is not as extensive as that produced by hydrothermal technologies such as steam explosion.⁵⁷ However, this direct comparison is unequitable because steam explosion is typically performed at higher severities and the reactor output discharge applies mechanical action to the biomass, which helps biomass disintegration. For an equalized comparison, the CTP data of Figure 5d compares hydrothermal and deacetylation treatments performed without any mechanical action applied to the pretreated biomass. Furthermore, variations in severity are equalized through a common x -axis (% solubilization in Figure 5d). This equalized comparison suggests the alkaline deacetylation can be more effective than mild hydrothermal treatments for the opening of biomass nanoscale pores. Clearly, this is indicating favorable physical-chemical phenomena taking place in the deacetylation pretreatment.

CONCLUSIONS

In summary, we have used multimodal characterization to investigate the impacts of alkaline deacetylation on sugar cane bagasse and straw. Our findings indicate that the deacetylation process primarily breaks ester bonds, releasing acetyl groups and breaking covalent links between lignin to hemicelluloses.

This facilitates a substantial introduction of nanoscale porosity, while the mild, low temperature conditions avoid undesirable processes such as cellulose cocrystallization and lignin aggregation which are often encountered in commonly employed hydrothermal pretreatments. Evidence of general reduced mechanical integrity of the tissue was also observed. Furthermore, compositional analysis revealed that the alkaline treatments solubilize most acetyl groups and some lignin from bagasse, while in straw solubilization of xylan and glucan is additionally observed under the same conditions. This contrast between bagasse and straw must be considered in the design of biorefineries. Finally, the combined attributes of chemical modifications and reduced mechanical integrity imparted by alkaline deacetylation suggest this pretreatment as a promising alternative for biorefineries having sugar cane bagasse and straw as feedstocks.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*C. Driemeier, e-mail: carlos.driemeier@ctbe.cnpem.br.

ORCID

Peter N. Ciesielski: 0000-0003-3360-9210

Carlos Driemeier: 0000-0002-4794-3714

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge financial support from CAPES, CNPq (455549/2014-1) and FAPESP (15/50590-4). The electron microscopy portion of this work was supported as part of the Center for Direct Catalytic Conversion of Biomass to Biofuels (C3Bio), an Energy Frontier Research Center funded by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Award Number DE-SC0000997.

REFERENCES

- (1) Hoogwijk, M.; Faaij, A.; van den Broek, R.; Berndes, G.; Gielen, D.; Turkenburg, W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass Bioenergy* **2003**, *25* (2), 119–133.
- (2) Parikka, M. Global biomass fuel resources. *Biomass Bioenergy* **2004**, *27* (6), 613–620.
- (3) Cortez, L. A. B. *Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability*; Blucher: São Paulo, 2010.
- (4) Dias, M. O. S.; Maciel Filho, R.; Mantelatto, P. E.; Cavalett, O.; Rossell, C. E. V.; Bonomi, A.; Leal, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environ. Dev.* **2015**, *15*, 35–51.
- (5) Soccol, C. R.; Vandenbergh, L. P. D. S.; Medeiros, A. B. P.; Karp, S. G.; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarello, A. P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (13), 4820–4825.
- (6) Junqueira, T. L.; Chagas, M. F.; Gouveia, V. L. R.; Rezende, M. C. A. F.; Watanabe, M. D. B.; Jesus, C. D. F.; Cavalett, O.; Milanez, A. Y.; Bonomi, A. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10* (1), 50.
- (7) Menandro, L. M. S.; Cantarella, H.; Franco, H. C. J.; Kölln, O. T.; Pimenta, M. T. B.; Sanches, G. M.; Rabelo, S. C.; Carvalho, J. L. N. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *11* (3), 488–504.
- (8) Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapfel, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96* (6), 673–686.
- (9) de Lima, D. R.; Silveira, M. H. L.; Del Rio, L.; Ramos, L. P. Pretreatment Processes for Cellulosic Ethanol Production: Processes Integration and Modeling for the Utilization of Lignocellulosics Such as Sugarcane Straw. In *Green Fuels Technology*; Soccol, C., Brar Kaur, S., Faulds, C., Ramos, L. P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 107–131.
- (10) Novacana. Exclusivo: Custo de produção estimado do etanol celulósico nas 6 maiores usinas do mundo. *Novacana* **2016**, 1–15.
- (11) Lynd, L. R.; Liang, X.; Biddy, M. J.; Allee, A.; Cai, H.; Foust, T.; Himmel, M. E.; Laser, M. S.; Wang, M.; Wyman, C. E. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *45* (C), 202–211.
- (12) Langan, P.; Petridis, L.; O'Neill, H. M.; Pingali, S. V.; Foston, M.; Nishiyama, Y.; Schulz, R.; Lindner, B.; Hanson, B. L.; Harton, S.; et al. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. *Green Chem.* **2014**, *16* (1), 63.
- (13) Ruiz, H. A.; Rodríguez-Jasso, R. M.; Fernandes, B. D.; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2013**, *21*, 35–51.
- (14) Rocha, G. J. M.; Gonçalves, A. R.; Nakanishi, S. C.; Nascimento, V. M.; Silva, V. F. N. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 810–816.
- (15) Mussatto, S.; Roberto, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour. Technol.* **2004**, *93* (1), 1–10.
- (16) Jönsson, L. J.; Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 103–112.
- (17) Trajano, H. L.; Engle, N. L.; Foston, M.; Ragauskas, A. J.; Tschaplinski, T. J.; Wyman, C. E. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6* (1), 110.
- (18) Narron, R. H.; Kim, H.; Chang, H.; Jameel, H.; Park, S. Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *38*, 39–46.
- (19) Driemeier, C.; Mendes, F. M.; Santucci, B. S.; Pimenta, M. T. B. Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. *Cellulose* **2015**, *22*, 2183.
- (20) Silveira, R. L.; Stoyanov, S. R.; Kovalenko, A.; Skaf, M. S. Cellulose Aggregation under Hydrothermal Pretreatment Conditions. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (8), 2582–2590.
- (21) Donaldson, L. A.; Wong, K. K. Y.; Mackie, K. L. Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Sci. Technol.* **1988**, *22* (2), 103–114.
- (22) Donohoe, B. S.; Decker, S. R.; Tucker, M. P.; Himmel, M. E.; Vinzant, T. B. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101* (5), 913–925.
- (23) Driemeier, C.; Oliveira, M. M.; Curvelo, A. A. S. Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *82*, 114–117.
- (24) Dai, J.; Cui, H.; Grace, J. R. Biomass feeding for thermochemical reactors. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2012**, *38* (5), 716–736.
- (25) Kim, J. S.; Lee, Y. Y.; Kim, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 42–48.
- (26) Chen, X.; Shekero, J.; Franden, M. A.; Wang, W.; Zhang, M.; Kuhn, E.; Johnson, D. K.; Tucker, M. P. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5* (1), 8.
- (27) Chen, X.; Shekero, J.; Pschorn, T.; Sabourin, M.; Tao, L.; Elander, R.; Park, S.; Jennings, E.; Nelson, R.; Trass, O.; et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1), 98.

- (28) Chen, X.; Kuhn, E.; Jennings, E. W.; Nelson, R.; Tao, L.; Zhang, M.; Tucker, M. P. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g L⁻¹) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (>10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or. *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9* (4), 1237–1245.
- (29) Chen, X.; Wang, W.; Ciesielski, P.; Trass, O.; Park, S.; Tao, L.; Tucker, M. P. Improving Sugar Yields and Reducing Enzyme Loadings in the Deacetylation and Mechanical Refining (DMR) Process through Multistage Disk and Szego Refining and Corresponding Techno-Economic Analysis. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4* (1), 324–333.
- (30) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Ash in Biomass-Laboratory Analytical Procedure (LAP)*; NREL/TP-510-42622; National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, 2008.
- (31) Sluiter, J. B.; Chum, H.; Gomes, A. C.; Tavares, R. P. A.; Azevedo, V.; Pimenta, M. T. B.; Rabelo, S. C.; Marabezi, K.; Curvelo, A. A. S.; Alves, A. R.; et al. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. *J. AOAC Int.* **2016**, *99* (3), 579–585.
- (32) Oliveira, R. P.; Driemeier, C. CRAFTS: a model to analyze two-dimensional X-ray diffraction patterns of plant cellulose. *J. Appl. Crystallogr.* **2013**, *46* (4), 1196–1210.
- (33) Driemeier, C.; Mendes, F. M.; Oliveira, M. M. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. *Cellulose* **2012**, *19* (4), 1051–1063.
- (34) Hailwood, A. J.; Horrobin, S. Absorption of water by polymers: analysis in terms of a simple model. *Trans. Faraday Soc.* **1946**, *42*, B084–B092.
- (35) Skaar, C. *Wood-water relations*; Springer: Berlin, 1988.
- (36) Mendes, F. M.; Ling, L. Y.; Driemeier, C. E. *Laboratory and data analysis procedures for determination of biomass nanoscale porosity employing calorimetric thermoporometry*; Brazilian Center for Research in Energy and Materials: Campinas, 2016.
- (37) Sene, C.; McCann, M. C.; Wilson, R. H.; Grinter, R. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell Walls and Their Components). *Plant Physiol.* **1994**, *106* (4), 1623–1631.
- (38) Chen, X.; Shekero, J.; Elander, R.; Tucker, M. Improved Xylan Hydrolysis of Corn Stover by Deacetylation with High Solids Dilute Acid Pretreatment. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51* (1), 70–76.
- (39) Shekero, J.; Chen, X.; Smith, H.; Tucker, M. P. Development and characterization of a high-solids deacetylation process. *Sustainable Chem. Processes* **2016**, *4* (1), 6.
- (40) Castro, R. C. de A.; Fonseca, B. G.; dos Santos, H. T. L.; Ferreira, I. S.; Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *106*, 65.
- (41) Leppänen, K.; Andersson, S.; Torkkeli, M.; Knaapila, M.; Kotelnikova, N.; Serimaa, R. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by X-ray scattering. *Cellulose* **2009**, *16* (6), 999–1015.
- (42) Driemeier, C.; Bragatto, J. Crystallite Width Determines Monolayer Hydration across a Wide Spectrum of Celluloses Isolated from Plants. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (1), 415–421.
- (43) Arantes, V.; Saddler, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4* (1), 3.
- (44) Ding, S.-Y.; Liu, Y.-S.; Zeng, Y.; Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Bayer, E. A. How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility? *Science (Washington, DC, U.S.)* **2012**, *338* (6110), 1055–1060.
- (45) Ciesielski, P. N.; Wang, W.; Chen, X.; Vinzant, T. B.; Tucker, M. P.; Decker, S. R.; Himmel, M. E.; Johnson, D. K.; Donohoe, B. S. Effect of mechanical disruption on the effectiveness of three reactors used for dilute acid pretreatment of corn stover Part 2: morphological and structural substrate analysis. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1), 47.
- (46) Carvalho, D. M. de; Sevastyanova, O.; Penna, L. S.; Silva, B. P. da; Lindström, M. E.; Colodette, J. L. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *73*, 118–126.
- (47) Pereira, S. C.; Maehara, L.; Machado, C. M. M.; Farinas, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 44.
- (48) Carvalho, D. M.; Queiroz, J. H. de; Colodette, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *94*, 932–941.
- (49) Zeng, M.; Ximenes, E.; Ladisch, M. R.; Mosier, N. S.; Vermerris, W.; Huang, C.-P.; Sherman, D. M. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (part 1). *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109* (2), 390–397.
- (50) Sun, Q.; Foston, M.; Meng, X.; Sawada, D.; Pingali, S.; O'Neill, H. M.; Li, H.; Wyman, C. E.; Langan, P.; Ragauskas, A. J.; et al. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultra-structure during dilute acid pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1), 150.
- (51) Pawar, P. M.-A.; Koutaniemi, S.; Tenkanen, M.; Mellerowicz, E. J. Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (May), 1–8.
- (52) Xu, F.; Sun, R.-C.; Sun, J.-X.; Liu, C.-F.; He, B.-H.; Fan, J.-S. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *552* (1–2), 207–217.
- (53) Scheller, H. V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 263–289.
- (54) Ju, Y.-H.; Huynh, L.-H.; Kasim, N. S.; Guo, T.-J.; Wang, J.-H.; Fazary, A. E. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (2), 591–599.
- (55) del Río, J. C.; Lino, A. G.; Colodette, J. L.; Lima, C. F.; Gutiérrez, A.; Martínez, A. T.; Lu, F.; Ralph, J.; Rencoret, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass Bioenergy* **2015**, *81*, 322–338.
- (56) de Oliveira, D. M.; Finger-Teixeira, A.; Rodrigues Mota, T.; Salvador, V. H.; Moreira-Vilar, F. C.; Correa Molinari, H. B.; Craig Mitchell, R. A.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O.; Dantas dos Santos, W. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13* (9), 1224–1232.
- (57) Inouye, H.; Zhang, Y.; Yang, L.; Venugopalan, N.; Fischetti, R. F.; Gleber, C. S.; Vogt, S.; Fowle, W.; Makowski, B.; Tucker, M.; et al. Multiscale deconstruction of molecular architecture in corn stover. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 3756.