

DANIELE LONGO MACHADO

ESTUDO DA ADSORÇÃO DAS ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDO A DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS E AVICEL

CAMPINAS 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

"ESTUDO DA ADSORÇÃO DAS ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDO A DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS E AVICEL"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. ALINE CARVALHO DA COSTA Co-orientador: Dr. JOSÉ GERALDO DA CRUZ PRADELLA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DATESE DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELE LONGO MACHADO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALINE CARVALHO DA COSTA.

fline C. da Costa Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Campinas 2013 iii Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

M18e	Machado, Daniele Longo, 1987- Estudo da adsorção das enzimas do complexo celulolítico em bagaço de cana- de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e Avicel / Daniele Longo Machado. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.
	Orientador: Aline Carvalho da Costa. Coorientador: José Geraldo da Cruz Pradella. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Lignocelulose. 2. Cinética de adsorção. 3. Isoterma de adsorção. 4. Hidrólise enzimática. I. Costa, Aline Carvalho, 1970 II. Pradella, José Geraldo da Cruz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of adsorption of enzymes from cellulolytic complex on Avicel and sugarcane bagasse submitted to different pretreatments Palavras-chave em inglês: Lignocellulose Adsorption kinetics Adsorption isotherm Enzymatic hydrolysis Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Titulação: Mestra em Engenharia Química Banca examinadora: Aline Carvalho da Costa [Orientador] Francisco Maugeri Filho Sarita Cândida Rabelo Data de defesa: 11-12-2013 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado defendida por Daniele Longo Machado e aprovada em 11 de dezembro de 2013, pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Meine C. da Costa

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa - Orientador

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (titular)

Sorita lândida fabelo Dra. Sarita Candida Rabelo (suplente)

RESUMO

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos compreende uma etapa de adsorção das enzimas celulases a esse material, e as chamadas isotermas de adsorção são curvas extremamente úteis nesse estudo, pois indicam a forma como o soluto (adsorbato) adsorverá no adsorvente; dão uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá, entre outras características importantes. São empregadas também para a obtenção de condições mais favoráveis e eficientes na conversão da biomassa a açúcares fermentescíveis. Assim, para melhor entendimento de como o processo da adsorção enzimática interfere nos rendimentos da hidrólise enzimática da celulose, este trabalho abordou estudos específicos, tais como, a determinação da cinética e dos parâmetros das isotermas de adsorção das enzimas do complexo celulolítico sobre diferentes biomassas. Trabalhou-se com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmico (BH) que apresentou 31,97% de lignina em sua composição e organossolve (BO), com 4,42% de lignina, e também com Avicel e com um isolado de lignina (IL). Os experimentos de cinética e isoterma de adsorção foram realizados em duplicata com volume reacional de 15 mL contendo tãmpão citrato de sódio 50 mM pH 4.8 complementado com 0.02% de azida sódica por grama de substrato onde a biomassa foi adicionada. Nos ensaios de cinética, os fracos foram incubados em um shaker (Marconi AM-832) a 50°C e 4°C, onde a agitação variou de 40 a 250 rpm. Foram recolhidas amostras dos frascos em tempos pré-determinados e centrifugadas por 15 min a 4,000 rpm para remoção dos materiais insolúveis. O teor de proteína do sobrenadante foi determinado usando o método de Bradford. As isotermas de adsorção da celulase para as biomassas foram conduzidas pela variação da quantidade proteica da enzima celulase (0, 1 - 4, 5 mg/mL). Os dados experimentais foram estimados pela isoterma de adsorção de Langmuir usando o software OriginPro 8.0. Os parâmetros E_{max} e K_p obtidos pelo ajuste dos dados experimentais mostraramse diferentes para os diferentes materiais. Uma maior capacidade de adsorção (36,93 mg celulase/g de substrato) e, consequentemente, uma afinidade maior da enzima celulase pelo bagaço pré-tratado foi observada para o pré-tratamento hidrotérmico, pois a celulase, além de adsorver na celulose, também adsorve na lignina, em menor extensão. Os dados obtidos da isoterma de adsorção da celulase sobre o IL confirmam a adsorção improdutiva da enzima na lignina (E_{max}= 11,92 mg/g) e mostram como esses estudos da adsorção das enzimas em IL são importantes, porque se torna possível distinguir a adsorção a porções da celulose e frações da lignina. A agitação exerceu influência significativa no fenômeno de adsorção, onde o aumento da agitação até 150 rpm melhorou a mistura entre as enzimas e o substratos, porém, a partir de 200 rpm não foram observadas mudanças significativas nos perfis de enzima adsorvida.

Palavras-chaves: Lignocelulose, cinética de adsorção, isoterma de adsorção, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass involves one step of adsorption of cellulase enzymes on this material, and the adsorption isotherms are curves extremely useful for this research, because they show how the solute (adsorbate) will adsorb on the adsorbent; give an estimate of what is highest quantity of solute adsorbed by the adsorbent, among other information. They are also used to attain more favorable and efficient conditions in the conversion of biomass into fermentable sugars. Therefore, for a better understanding of how the enzymatic adsorption process interferes in the enzymatic hydrolysis of cellulose yields, this study has proposed specific studies, such as the determination of the kinetics and parameters of adsorption isotherms of enzymes from cellulolityc complex on different biomasses. Sugarcane bagasse hydrothermal pretreated (BH), which presented 31.97% (w/w) of lignin in its composition, and the organosolv (BO), with 4.42% (w/w) of lignin, were evaluated, as well as Avicel and an isolated lignin (IL). The adsorption kinetics and isotherm experiments assays were performed in duplicate with reaction volume of 15 mL of sodium citrate buffer 50 mM pH 4.8 supplemented with 0.02% sodium azide per gram of substrate to which biomass was added. The adsorption kinetics assays the flasks were incubated in shaker (Marconi AM-832) at 50°C and 4°C where the stirring ranged from 40 to 250 rpm. Flasks were withdrawn at different time intervals and centrifuged repeatedly for 15 min in a centrifuge at 4,000 rpm to remove insoluble materials. The protein content of the supernatant was determined using Bradford method (Bradford, 1976). Cellulase adsorption isotherm on biomasses was conducted by varying the amount of cellulase protein (0.1-4.5 mg/mL). The experimental data were fit to the Langmuir adsorption isotherm using the software OriginPro 8.0. The parameters Emax and Kp estimated by experimental data adjustment showed different values to the different materials. The highest adsorption capacity (36.93 mg of cellulase/ g of substrate) and, consequently, the highest affinity of the cellulase enzyme for the pretreated bagasse was found for the hydrothermal pretreated bagasse, as cellulase, besides adsorbing on cellulose, also adsorbs on lignin to a lesser extent. The cellulase adsorption on IL data confirms the unproductive adsorption of the enzyme on lignin (Emax = 11.92 mg/g) and shows how these adsorption studies of enzymes in IL are relevant, because it becomes feasible to distinguish the adsorption on portions of cellulose and on lignin fractions. Stirring had significant influence on the adsorption phenomenon, with the increase in stirring up to 150 rpm improving the mixture of enzymes and substrate; however, over 200 rpm stirring influence was not significant.

Key-words: Lignocellulose, adsorption kinetics, isotherm adsorption, enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. A cana-de-açúcar	7
2.3. Biomassa lignocelulósica e bagaço de cana-de-açucar	9
2.3.2. Hemiceluloses	. 12
2.3.3. Lignina	. 13
2.4. Pré-tratamento	. 15
2.4.1. Pré-tratamentos físicos	. 18
2.4.2. Pré-tratamentos químicos	. 20
2.4.3. Pré-tratamento Biológico	. 24
2.5.1. Hidrólise Ácida	. 25
2.5.2. Hidrólise enzimática	. 25
2.6. Processo de adsorção de moléculas	. 30
2.6.2. Isotermas de adsorção	. 31
2.7. Considerações da transferência de massa na hidrólise enzimática de mater celulósicos	riais . 33
2.8. Adsorção de celulase e β-glicosidase em substratos celulósicos	. 35
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
3.1. Matéria-Prima	. 39
3.2. Pré-tratamentos	. 39
3.2.1. Pré-tratamento hidrotérmico	. 39
3.2.2. Pré-tratamento organossolve	. 40
3.3. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	. 40
3.3.1 Teor de umidade	. 41
3.3.2. Determinação do teor de cinzas na biomassa	. 41

SUMÁRIO

3.3.3. Determinação do teor de carboidratos, lignina, ácido acético, furfural	e
hidroximetilfurfural na biomassa	42
3.4. Determinação da concentração de proteína	47
3.4.1. Determinação da concentração de proteína nas enzimas celulase e β -glicosidase	48
3.5. Métodos analíticos para a quantificação de Açúcares	49
3.5.1. Quantificação de Glicose	49
3.6. Determinação da atividade enzimática	50
3.6.1. Determinação da atividade da celulase	51
3.6.2. Determinação da atividade da β-glicosidase	52
3.6.3. Determinação da atividade enzimática	53
3.7. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado	55
3.7.1. Quantificação dos Carboidratos no Hidrolisado	55
3.8. Cinética e isoterma de adsorção da celulase na biomassa	56
3.9. Cinética de adsorção da β-glicosidase na biomassa	58
3.10. Preparação da lignina	59
3.11. Cinética e isoterma de adsorção da celulase na lignina	59
3.12. Análise estatística	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	. 61
4.1. Análise da composição química dos bagaços	61
4.2. Preparação do isolado de lignina	65
4.3. Estudo da cinética de adsorção das enzimas celulase e β -glicosidase nos frascos	de
vidro Erlenmeyer	66
4.4. Estudo da cinética de adsorção da enzima β -glicosidase no bagaço de cana-de-açú	icar
pré-tratado pelo método hidrotérmico e na celulose pura (Avicel) a 50°C	69
4.5. Estudo da cinética de adsorção da enzima celulase no bagaço de cana pré-tratado p	elo
metodo nidrotermico e na celulose pura (Avicel) a 4°C	/1

4.6. Avaliação dos efeitos: agitação e concentração de substrato, na cinética de adsorção da
celulase em Avicel
4.7. Avaliação do efeito da agitação e da concentração de substrato na cinética de adsorção da celulase em bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico 78
4.8. Avaliação do efeito da agitação e da concentração de substrato na cinética de adsorção da celulase em bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento organossolve 83
4.9. Avaliação das isotermas de adsorção da celulase nas três biomassas: Avicel e bagaço de cana-de-açúcar submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve
4.10. Avaliação das cinética e isoterma de adsorção da celulase em isolado de lignina proveniente do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico 97
4.11. Avaliação da hidrólise dos bagaços pré-tratados em concentrações proteícas diferentes
da enzima celulase 100
Referências Bibliográficas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus país, Rosana e José Araujo, aos meus irmãos, Rafael e Felipe e às lembranças do meu avô, Antônio Machado, que muitas saudades nos deixou.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e luz em todos os dias da minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa, que muito contribuiu para meu crescimento científico e intelectual, além da excelente orientação, e pelas sugestões ao longo do trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. José Geraldo da Cruz Pradella, pelas sugestões e pelo fornecimento da preparação cululásica Celluclast 1.5, utilizada neste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, pelo uso da infraestrutura.

Aos meus pais, Rosana e José Araujo, pelo exemplo de sabedoria, força e persistência, e aos meus irmãos, Rafael e Felipe, e a minha amada vó, Lourdes Castilho Machado, pelo apoio, incentivo e carinho.

Ao meu namorado, João Paulo, pela paciência, amor e incentivo constante.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), André Cesário, Paulinha, Rafael Ramos e em especial a Luiza Helena e o João Moreira Neto, pela ajuda, companhia e amizade por toda hora. As minhas queridas amigas da Unicamp, Andrea Komessu e Kelly Lendini, pelo carinho e amizade verdadeira.

À Dr^a Sarita Candida Rabelo pelo fornecimento e realização das análises de composição dos bagaços de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado, além das suas sugestões.

As minhas amigas, Layse Beneli, Ana Roberta, Vanessa e Mariana, que mesmo longe estiveram perto, com seus apoios e estímulos.

Aos meus amigos de Campinas, que conheci há pouco tempo, mas já são muito importantes, Lídia, Bruno Colling, Vinícius, Luma, Alex, Kalina, Daíse e Caio Munhoz.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais países produtores da cana-de-açúcar (Fonte: FAO, 2011)7
Figura 2: Representação esquemática da planta de cana-de-açúcar destacando as folhas,
ponteiras e colmo. Fonte: ARBEX et al. (2004) apud GEORGES (2011)8
Figura 3: Arranjo da estrutura da parede celular vegetal de materiais lignocelulósicos.
Fonte: (SANTOS <i>et al.</i> , 2011)9
Figura 4: Representação da cadeia linear de celulose11
Figura 5: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e
WEGENER, 1989)12
Figura 6: Monômeros de espécie monolignol. (a) álcool p-cumarílico (4-hidroxi fenil, H),
(b) álcool coniferílico (guaiacil, G), (c) álcool sinapílico. Fonte: DOHERTY et al., 2011).14
Figura 7: Figura das alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina de
materiais lignocelulósicos após pré-tratamento. Adaptado (SANTOS et al., 2011)16
Figura 8: Figura da atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da
celulose. Fonte: (adaptado de CASTRO & PEREIRA Jr, 2010)27
Figura 9: Figura da interação entre o domínio catalítico de ligação da celulose (CBD) e a
superfície da celulose. Fonte: (SciDAC, 2010)28
Figura 10: *C representa a concentração de soluto em solução e ω representa a quantidade
adsorvida por quantidade de adsorvente. Classificação das isotermas de Giles et al., (1970).
32
Figura 11: Curva elaborada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. O
gráfico correlaciona a concentração de proteínas com a absorbância a 595 nm48
Figura 12: Comportamento da enzima celulase. Logaritmo da concentração da enzima em
função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída53
Figura 13: Gráfico da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada por
1,0 mL da enzima β-glicosidase diluída54
Figura 14: Foto do bagaço in natura (a); e pré-tratado pelos métodos: Hidrotérmico,
190°C/10 minutos (b), Organossolve 190°C/150 minutos (c)63
Figura 15: Imagens da MEV nas ampliações de 50X, 250 X e 1000X, respectivamente para
(a, b e c) bagaço in natura, (d, e, f) bagaço pré-tratado hidrotérmico e (g, h e i) bagaço pré-
tratado organossolve64

Figura 16: Quantidade de celulase livre com o tempo reacional. Condições de reação: temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm, concentrações iniciais de celulase de 0,2 e 0,4 mg/mL (correspondentes a 4mg/g substrato) referentes a cargas de sólidos de 5% e 10 % (m/v) respectivamente.-----68 Figura 17: Quantidade de β -glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm, concentrações iniciais de β-glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2mg/g substrato) referentes a cargas de sólidos de 5% e 10% (m/v) respectivamente.-----68 Figura 18: Quantidade de β-glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: 50°C, agitação de 150 rpm sob as concentrações iniciais de β -glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2 mg/g de Avicel) referentes a 5% e 10% de sólidos (m/v), respectivamente.----70 Figura 19: Quantidade de β-glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: 50°C, agitação de 150 rpm sob concentrações iniciais de β -glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2 mg/g de bagaço) referentes a 5% e 10% de sólidos (m/v) respectivamente.----70 Figura 20: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado a 4°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm com e sem a adição de glicose, concentração inicial de bagaço 5% (m/v), carga de celulase de 4 mg de proteína/g de bagaço e relação glicose/enzima 250:1. -----72 Figura 21: Cinética da adsorção da celulase na Avicel a 4°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm com e sem a adição de glicose, concentração inicial de bagaço 5% (m/v), carga de celulase de 4 mg de proteína/g de bagaço e relação glicose/enzima 250:1.----73 Figura 22: Cinética da adsorção da celulase na Avicel sob as agitações (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) a 50°C, 4 mg de celulase/g de Avicel (a) com concentração inicial de Avicel de 5% (m/v) e (b) com concentração inicial de Avicel de 10% (m/v). ----75 Figura 23: Cinética da adsorção da celulase em Avicel à 50°C, sob duas concentrações iniciais de bagaço (5% e 10 % m/v) com carga de celulase de 4 mg de proteína/g Avicel e sob as diferentes agitações: (a) 100 rpm, (b) 150 rpm e (c) 200 rpm. -----78 Figura 24: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado sob diferentes agitações (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) a 50°C, 4 mg de celulase/g de substrato (a) com concentração inicial de bagaço de 5% (m/v) e (b) 10% (m/v). -----79

Figura 28: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em Avicel a 4°C, sob agitação de 150 rpm, por 30 minutos, na concentração inicial de 5% de Avicel (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose. -----90 Figura 29: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em Avicel a 50°C, sob agitação de 150 rpm, por 30 minutos, na concentração inicial de 5% de Avicel (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose. -----91 Figura 30: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BH a 4°C, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas, com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose. -----94 Figura 31: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BH a 50°C e, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas, com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose. -----95 Figura 32: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BO a 50°C, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose. -----96 Figura 33: Cinética da adsorção da celulase no isolado de lignina em 50°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm sob a concentração inicial de isolado de lignina (5% m/v) com carga de celulase de 4 mg de proteína/g de isolado de lignina. -----98 Figura 34: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em lignina a 50°C e pH 4,8 sob agitação de 150 rpm com adição de glicose por 2 horas com concentração inicial de 5% isolado de lignina (m/v) e celulase, 0,1-4,5 mg/mL. ----- 100

Figura 35: Comparação entre os perfis de liberação de glicose na hidrólise (a) de BH e (b) BO. Os ensaios foram realizados com 5% de sólidos (m/v), utilizando diferentes concentrações protéicas da enzima celulase (Celluclast 1.5 L) com adição de 25 CBU/g de bagaço da enzima β - glicosidase (Sigma).-----102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média nos colmos da cana-de-açúcar. 8
Tabela 2: Composição média em carboidratos e lignina de algumas matérias-primas
lignocelulósicas
Tabela 3: Sumário das diferentes tecnologias de pré-tratamento e as alterações que ocorrem
nas características composicionais da biomassa lignocelulósica
Tabela 4: Principais passos da hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos
Tabela 5: Lista de alguns estudos da adsorção de celulase que usam a isoterma de
Langmuir
Tabela 6: Faixa de concentração dos padrões usados na curva de calibração. 45
Tabela 7: Teor de proteína das enzimas do complexo celulolítico
Tabela 8: Faixa de concentração dos padrões usados na curva de calibração. 56
Tabela 9: Arranjo experimental para as cinéticas e isotermas de adsorção das enzimas 56
Tabela 10: Composição química dos bagaços in natura e pré-tratados pelo método
hidrotérmico e organossolve
Tabela 11: Composição para o bagaço de cana seco antes e após os pré-tratamentos
hidrotérmico e organossolve, corrigido pelos rendimentos dos pré-tratamentos
Tabela 12: Balanço de massa da hidrólise enzimática para obtenção do isolado de lignina.65
Tabela 13: Constantes de adsorção de Langmuir para os diferentes substratos (dados
experimentais nas Figuras 28 a 32)
Tabela 14: Constantes de adsorção de Langmuir para o isolado de lignina proveniente do
BH

LISTA DE SIGLAS

- DP/GP *Degree of Polimerization*/Grau de Polimerização
- AFEX Pré-tratamento de Explosão a vapor com amônia
- EnG Endoglicanases
- ExG/CBH Exoglicanases ou Celobiohidrolases
- BG β-Glicosidase
- CBD Cellulose Binding Domain
- NREL National Renewable Energy Laboratory
- CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- BG-250 Corante Coomassie Brilliant Blue G 250
- ART Açúcares Redutores Totais
- DNS Método do Ácido dinitosalicilico
- IUPAC União Internacional de Química Pura e aplicada
- IL Isolado de Liginina proveniente do bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- BH Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmico
- BO Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado organossolve

1. INTRODUÇÃO

Durante as ultimas décadas, devido à escassez de energia fóssil e a poluição ambiental gerada a partir da mesma, o interesse em diferentes fontes de energia (sustentáveis e renováveis) vem crescendo em muitos países (ZHAO *et al.*, 2009). Dentre as energias ditas como limpas, o etanol é considerado como combustível sustentável devido a algumas de suas vantagens, como características de queima limpa, redução da emissão de materiais particulados e NOx, entre outras. (PRASAD *et al.*, 2007). Porém, a produção do etanol a partir de grãos muitas vezes não é sustentável e nem economicamente viável em muitos países. Entretanto, uma nova tecnologia, o etanol de segunda geração, produzido a partir de biomassa lignocelulósica, tem se tornado um potencial atrativo para diversos países.

Dentre as biomassas lignocelulósicas, o bagaço de cana-de-açúcar, que é um resíduo agroindustrial obtido após a moagem dos talos de cana para a extração da sacarose, é uma das matérias-primas lignocelulósicas mais promissoras e abundantes (DRIEMEIER *et al.*, 2011). No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo agroindustrial, sendo produzidos cerca de 250 Kg de bagaço úmido por tonelada de cana-de-açúcar (ZANIN *et al.*, 2000; WYMAN *et al.*, 2005 *apud* VARGAS BETANCUR & PEREIRA Jr; 2010). Parte deste bagaço é usado no processo de co-geração de energia. Se o bagaço de cana for usado para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática, necessita passar primeiramente por um processo denominado pré-tratamento, que é necessário para alterar características estruturais da lignocelulose, aumentando a acessibilidade das enzimas para propiciar uma hidrólise enzimática mais eficiente com melhores rendimentos de açúcares (ALVIRA *et al.*, 2010). Diversas tecnologias de pré-tratamento são estudas, e elas podem ser divididas em três categorias principais: pré-tratamentos biológicos, físicos e químicos (ZHENG *et al.*, 2009). Entretanto, uma combinação entre os métodos, seja de uma mesma categoria ou categorias diferentes, também pode ser realizado (ALVIRA *et al.*, 2010).

Após o passo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, onde a biomassa pré-tratada sofreu alterações fisícas e quimícas em sua matriz lignocelulósica, tais como a quebra parcial ou total da lignina, e a remoção parcial das hemiceluloses, a celulose torna-se mais acessivel à hidrólise por ácidos ou enzimas. A etapa da hidrólise é onde ocorre a conversão da celulose a açúcares fermentescíveis. Essa conversão pode ser realizada via hidrólise ácida ou hidrólise enzimática. Embora a hidrólise ácida seja relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Além disso, se as condições de reação (temperatura, concentração de ácido) não forem muito bem controladas, ocorre degradação dos produtos finais, incluindo a degradação da glicose, o que não ocorre na hidrólise enzimática devido à especificidade da enzima (FINGERUT *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática é realizada por um complexo celulolítico constituído em geral por três tipos de celulases: endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e β -glicosidases ou celobiases (GAN, *et al.*, 2003), que agem em sinergia. A interação entre as enzimas e a matriz lignocelulósica é complexa, e com isso alguns problemas de adsorção não produtiva à lignina ocasionam baixos rendimentos na hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática compreende uma etapa de adsorção das celulases no material lignocelulósico. Para melhor entendimento de como o processo da adsorção enzimática interfere nos rendimentos da hidrólise enzimatica da celulose, muitos pesquisadores (ZHENG, 2007; QI, *et al.*, 2011; HONG, *et al.*, 2007) fazem o uso das isotermas de adsorção das celulases sobre os materiais lignocelulósicos pré-tratados e/ou Avicel. As isotermas de adsorção são curvas extremamente úteis, pois indicam a forma como o soluto (adsorbato) adsorverá efetivamente no adsorvente, dando ainda uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá. Podem ser, ainda, empregadas para a obtenção de condições mais favoráveis e eficientes na conversão da biomassa a açúcares fermentescíveis (MORENO-CASTILLA, 2004; MEZZARI, 2002).

Assim, este trabalho abordará estudos específicos como a determinação da cinética e dos parâmetros das isotermas de adsorção das enzimas do complexo celulolítico sobre diferentes biomassas. Para isso, escolheu-se trabalhar com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmico e organossolve além da Avicel e com um isolado de lignina, a fim de se determinar parâmetros efetivos que possam melhorar o rendimento da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, tais como, a máxima quantidade de enzima adsorvida na celulose e lignina, os coeficientes de afinidade das enzimas sobre cada material e a influência da agitação.

1.1 Objetivo

Dentro do contexto apresentado neste trabalho, o objetivo foi estudar a adsorção enzimática da celulase e β -glicosidase no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadado hidrotérmico e organossolve e na celulose pura microcristalina Avicel, assim como em um isolado de lignina. Para isso, as etapas seguintes foram seguidas:

- Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado;
- Determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas das enzimas do complexo celulolítico;
- Análise da cinética de adsorção das enzimas β-glicosidase e celulase sobre os diferentes substratos (bagaço pré-tratado hidrotérmico, bagaço pré-tratado organossolve, Avicel PH 101 e na lignina isolada do bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico), investigando a influência em diferentes concentrações de sólidos, agitação, temperatura e na presença de glicose;
- Estudo das isotermas de adsorção em duas temperaturas (4°C e 50°C) com ou sem a adição de glicose (para inibição da reação de hidrólise) ao meio reacional;
- Realização de hidrólise enzimática para correlacionar o E_{max} da adsorção com a taxa e rendimento de hidrólise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, originária da Indonésia e Nova Guiné, é uma planta pertencente à família Poace do gênero *Saccharum*, cujas variedades comerciais cultivadas atualmente no Brasil, são híbridas, obtidas de cruzamentos realizados no século XX, na ilha de Java (CIB, 2009), a partir das espécies genéticas *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum* (MATSUOKA, 1996; MATSUOKA *et al.*, 1999).

No Brasil a cana foi introduzida no século XVI e disseminada no Nordeste, onde os engenhos de açúcar se multiplicaram, sendo, ainda, o país na primeira posição do ranking mundial na produção da cultura (CIB, 2009). A Figura 1 mostra os principais países produtores da cana-de-açúcar.



Figura 1: Principais países produtores da cana-de-açúcar (Fonte: FAO, 2011).

Em sua fisiologia, a cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4 com alta capacidade fotossintética, apresentando melhor desenvolvimento e crescimento em regiões tropicais e

subtropicais (MATSUOKA, 1996). Morfologicamente esta planta é composta por pontas e folhas (palha da cana), colmos (fibras e sacarose) e pelas raízes, como representado pela Figura 2.



Figura 2: Representação esquemática da planta de cana-de-açúcar destacando as folhas, ponteiras e colmo. Fonte: ARBEX *et al.* (2004) *apud* GEORGES (2011).

Em geral a cana apresenta a seguinte composição:

Composição	Teor (%)
Água	63-76
Sólidos Totais	24-27
Fibras	11-16
Sólidos solúveis	10-16

Tabela 1: Composição média nos colmos da cana-de-açúcar.

Fonte: Modificado de CHEN & CHOU (1993).

A composição química da cana pode variar de acordo com a variedade da muda empregada, região de cultivo e clima. Os principais componentes macromoleculares da cana-de-açúcar são: celulose (38-50%), polioses ou hemiceluloses (25-27%) e lignina (20-30%). Outros componentes como extratos orgânicos e minerais inorgânicos variam de 5-20% (GEORGES, 2011).

No processamento da cana-de-açúcar, após a separação do caldo na moenda, do qual são produzidos o açúcar e o álcool etílico, há a geração do bagaço, que é em parte queimado para a geração de energia para a própria usina (BIOETANOL DE CANA-DE-AÇUCAR, 2008), que

atualmente vem sendo comercializada para reduzir os problemas da crise no fornecimento de energia elétrica. Como o Brasil é o maior produtor de cana-de açúcar, o bagaço é o seu principal resíduo agroindustrial (ZANIN *et al.*, 2000; WYMAN *et al.*, 2005 *apud* VARGAS BETANCUR & PEREIRA Jr; 2010).

2.3. Biomassa lignocelulósica e bagaço de cana-de-açucar

A conversão eficiente do material lignocelulósico em etanol tem se tornado uma das prioridades na produção de combustíveis renováveis (GÍRIO *et al.*, 2010). Muitas revisões têm abordado o tema da produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas (CORDONA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012; OJEDA *et al.*, 2011; SHIELDS & BOOPATHY, 2011; DIAS *et al.*, 2012).

Como todo material lignocelulósico, o bagaço da cana-de-açúcar consiste de feixes de fibras e outras estruturas elementares, como vasos parênquima e células epiteliais, como mostrado na Figura 3.



Figura 3: Arranjo da estrutura da parede celular vegetal de materiais lignocelulósicos. Fonte: (SANTOS *et al.*, 2011).

Sua composição média é de 50% de umidade, 2% de Brix (sólidos solúveis em água), 46% de fibra (32 - 50% de celulose, 19 - 25% de hemiceluloses e 23-32% de lignina) e 2% de cinzas (SILVA, 2010). Pelo fato do bagaço apresentar baixa quantidade de cinzas (2%), ele oferece inúmeras vantagens em comparação com outros resíduos agroindustriais como palha de

arroz (14,5%), palha do bagaço de cana-de-açúcar (9,61%), palha de trigo (9,2%) e casca de arroz (16%). (CARDONA, *et al.*, 2010; AYALA, 2012).

A Tabela 2 apresenta a composição química média em porcentagem de alguns materiais lignocelulósicos, incluindo a composição do bagaço.

Matérias-	Composição	Defenêncies		
primas —	Celulose	Hemiceluloses	Lignina	_ Referencias
		39.8	6.7 - 13.9	CAO et al.
Sabuga da milha	22 2 45 6			(1987);
Sabugo de minio	32.3 - 43.0			McKENDRY,
				(2002)
Dalha da milha	35.1 - 39.5 20.7 - 24.	20.7 24.6	11.0 10.1	MOSIER et al.
Fama de minio		20.7 - 24.0	11.0 - 19.1	(2005)
Talha da algadão	21	11	30	RUBIO et al.
Tallio de algodao	51			(1998)
Dolho do trigo	25 20	22-30	12 – 16	GROHMANN et
r allia de trigo	55 - 59			al. (1985)
Farala da trigo	10.5 14.8	35.5 - 39.2	8.3 - 12.5	MIRON <i>et al</i> .
rareio de trigo	10.3 - 14.8			(2001)
		28-32	15 – 25	ALVES et al.
Pagago do como	de cana çúcar 36 – 43			(2010);
da aquícar				CASTRO e
ue açucai				PEREIRA JR,
				(2010).

 Tabela 2: Composição média em carboidratos e lignina de algumas matérias-primas lignocelulósicas.

Fonte: Tabela adaptada de MENON & RAO (2012).

2.3.1. Celulose

A celulose é o polissacarídeo em maior abundância na natureza. É um monopolímero linear de alto peso molecular e de cadeia longa, cuja composição, $(C_6H_{10}O_5)_n$, é o principal constituinte estrutural da parede celular dos vegetais, constituindo aproximadamente 50% da biomassa (MEDEIROS, 2004). Apresenta em sua estrutura duas unidades de celobiose (dímeros de glicose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização (DP) que varia de 100 a 2000 DP. A Figura 4 representa a cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.



Figura 4: Representação da cadeia linear de celulose. Fonte: http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/carb.htm. Acesso: 18/01/2012.

As longas cadeias de celobiose, combinadas a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm em eletromicrofibrilas tornam a celulose resistente. Esse polímero tem tendência a formar ligações de hidrogênio, de maneira que as cadeias unem-se formando feixes que apresentam regiões nitidamente cristalinas, mas também é constituída por regiões amorfas. Estas duas porções, cristalina e amorfa, apresentam diferenças quando se trata da digestibilidade da biomassa mediante ataque enzimático (FENGEL e WEGENER, 1989).

As zonas com estruturas cristalinas são formadas através de interações de Van der Waals entre as cadeias poliméricas, em sua maioria bastante ordenadas, que não permitem que água penetre no seu interior. As zonas amorfas e secas podem absorver água e tornar a celulose macia e flexível. Estas ligações, juntamente com as zonas cristalinas, que se alternam com zonas amorfas, correspondem a aproximadamente dois terços da celulose presente na madeira. Apesar da natureza higroscópica das moléculas individuais de celulose, a absorção de moléculas de água só é possível nas zonas amorfas devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina. A organização cristalina da celulose influencia a sua reatividade ao controlar o acesso de substâncias químicas ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas (FERREIRA & ROCHA, 2009).

2.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo composto mais abundantes da biomassa lignocelulósica, sendo uma classe de polímeros heterogêneos que representam cerca de 15-35% da biomassa de vegetais e que podem conter em sua estrutura: pentoses (β -D-xilose, α -L arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácidos: α -D-glucorônico, α -D-4-O-metildalacturônico e α -D-galacturônico), como representado pela Figura 5. Outros açúcares como α -L-raminose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades, e grupos hidroxilas de açúcares podem ser substituídos parcialmente por grupos acetil.



Figura 5: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

As hemiceluloses são bastante hidrofílicas, contêm considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa e DP (*Degree of Polimerization*) variando entre menos de 100 a no máximo 200 (SILVA, 2010).
As hemiceluloses mais proeminentes são as xilanas e glucomananas, sendo as xilanas as mais abundantes. As xilanas são os principais componentes hemicelulolíticos da parede secundária de vegetais, constituindo entre 20-30% da biomassa de madeiras e vegetais. Em alguns tecidos de gramíneas e cereais, as xilanas apresentam-se em até 50% da biomassa (EBRINGÉVORÁ *et al.*, 2005 *apud* GÍRIO *et al.*, 2010). As xilanas estão geralmente disponíveis em grandes quantidades como subprodutos de florestas, agricultura, agro-industriais, indústrias de madeira e de papel e celulose. Manana, um tipo de hemicelulose na forma glucomanas e galactoglucomananas, está em menores quantidades nas madeiras, mas dependendo da origem biológica, diferentes estruturas de hemiceluloses podem ser encontradas.

Após o pré-tratamento, a estrutura das hemiceluloses é quebrada em monômeros (GÍRIO *et al.*, 2010). No bagaço de cana-de-açúcar as hemiceluloses se encontram na proporção de 25 a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (NEUREITER *et al.*, 2002; DEKKER & WALLIS, 1983 *apud* GÍRIO *et al*, 2010).

2.3.3. Lignina

A lignina apresenta como principal característica o grande potencial estrutural que confere força e rigidez às paredes das células vegetais e constitui entre 15% e 40% do peso da matéria seca de lenhosas. Ela preenche os espaços entre a celulose, hemiceluloses e componentes de pectina, desempenhando um papel crucial na eficiência da condução de água nas plantas vasculares (ZHANG *et al.*, 2012). Além disso, proporciona mais resistência ao ataque biológico de várias formas do que a celulose e outros polissacarídeos (DOHERTY *et al.*, 2011). Plantas com alto teor de lignina têm sido reportadas como mais resistentes ao calor e frio (MIIDLA, 1980 *apud* DOHERTY *et al.*, 2011).

A lignina não possui uma estrutura primária definida e é heterogênea. Consiste de múltiplas moléculas de fenilpropanóides reticuladas. Acredita-se ser derivada de três monômeros (álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico) (Figura 6) que são unidos por outro tipo de ligação (ZHANG *et al.*, 2012). A massa molecular de isolados de lignina está na faixa de 1000-2000g/mol, mas o grau de polimerização (DP) é difícil de medir, uma vez que a lignina é

invariavelmente fragmentada durante a extração e consiste de diferentes tipos de subestruturas, os quais se repetem de maneira casual.



Figura 6: Monômeros de espécie monolignol. (a) álcool p-cumarílico (4-hidroxi fenil, H), (b) álcool coniferílico (guaiacil, G), (c) álcool sinapílico. Fonte: DOHERTY *et al.*, 2011).

As estruturas dos monômeros na lignina consistem do mesmo esqueleto dos fenilpropanóides, mas diferem no grau de substituição de oxigênio no anel fenil. A estrutura H (4-hidroxi fenil) tem um grupo hidroxi ou metoxi, a estrutura G (guaiacil) tem os dois grupos, e a estrutura S (siringil) têm os três. As ligninas de gramíneas, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, apresentam grupos p-cumaril, além de grupos siringil e guaiacil (FENGEL e WEGENER, 1989; FERNANDEZ *et al.*, 1990; FAIX *et al.*, 1992).

Devido a sua estrutura, a lignina é a responsável pela redução da acessibilidade das enzimas à celulose e à hemicelulose (ZHANG *et al.*, 2012).

A lignina, tal como as hemiceluloses, normalmente começa a se dissolver na água em torno de 180 °C sob condições neutras (BOBLETER, 1994). A solubilidade da lignina em ambiente ácido, neutro ou alcalino depende, contudo, do precursor (p-cumarílico, coniferilíco, sinapílico ou uma combinação deles) da lignina (GRABBER, 2005).

2.3.4. Outras substâncias

Os extrativos são uma fração significativa dos compostos químicos existentes nos materiais lignocelulósicos. Estas substâncias podem ser extraídas utilizando-se diversos solventes, e em alguns casos, os extrativos são classificados pelo tipo de solvente empregado para extraí-los (BRAGATTO, 2010). Esses extrativos são substâncias orgânicas extrínsecas, ou seja,

não fazem parte da parede celular. As cinzas também são encontradas em grande quantidade nos materiais lignocelulósicos e também não fazem parte da estrutura da parede celular. Compostos inorgânicos (cinzas) são encontrados na forma de sais, sendo os mais significativos os compostos de silício, cálcio e magnésio (BRAGATTO, 2010).

Os extrativos do bagaço compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, que podem ser extraídas utilizando solventes polares e apolares. Estas substâncias são terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (FENGEL & WEGENER, 1989).

2.4. Pré-tratamento

Além de ser considerado um passo crucial na conversão biológica de etanol, o prétratamento da biomassa lignocelulósica representa um dos passos mais dispendiosos no processo. Na verdade, ele tem sido descrito como a segunda etapa mais cara na conversão de lignocelulose para o etanol quando seguido de hidrólise enzimática (MOSIER *et al.*, 2005b *apud* ALVIRA *et al.*, 2010).

Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes propriedades físicoquímicas, é necessário adotar tecnologias apropriadas de pré-tratamentos com base nas características da biomassa lignocelulósica de cada matéria-prima. Com isso, o pré-tratamento torna-se um passo necessário para alterar características estruturais da lignocelulose, aumentando a acessibilidade das enzimas e propiciando uma hidrólise mais eficiente e melhores rendimentos de açúcares (ALVIRA *et al.*, 2010).

Como o complexo lignocelulósico é composto por uma matriz de celulose e lignina ligada por redes de hemiceluloses, durante o pré-tratamento essa matriz deve ser modificada para facilitar o ataque enzimático. Alguns pré-tratamentos removem parte das hemiceluloses e lignina, outros apenas parte das hemiceluloses e ainda há pré-tratamentos que não mudam a composição da biomassa. Outros aspectos também podem interferir na hidrólise enzimática da celulose como, por exemplo, a porosidade da superfície de materiais lignocelulósicos que limitam a hidrólise por não permitirem o acesso das enzimas à celulose, e com um pré-tratamento adequado, a área superficial pode aumentar e melhorar a acessibilidade enzimática (ALVIRA *et al.*, 2010), como representado pela Figura 7. Esta figura é apenas representativa e não mostra a complexidade da forma como celulose/hemicelulose/lignina estão interligadas no material lignocelulósico.



Figura 7: Figura das alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina de materiais lignocelulósicos após pré-tratamento. Adaptado (SANTOS *et al.*, 2011).

O rendimento da hidrólise enzimática é inferior a 20% quando não são realizados prétratamentos (LYND, 1996), enquanto que o rendimento após pré-tratamento pode chegar próximo dos 100% (RABELO, 2010). Portanto é importante que um pré-tratamento seja realizado.

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido sugeridos, mas um método universal ainda não existe devido à complexidade e variedade de materiais lignocelulósicos. As técnicas de prétratamento podem ser divididas em três categoriais: pré-tratamentos biológicos, físicos e químicos (ZHENG *et al.*, 2009). Entretanto, uma combinação entre os métodos, seja de uma mesma categoria ou categorias diferentes, também pode ser realizada (ALVIRA *et al.*, 2010).

Vários métodos de pré-tratamentos para materiais lignocelulósicos foram e estão sendo estudados; a Tabela 3 apresenta alguns deles.

Pré-tratamento		Características composicionais			Geração de	Vantooona	Description
		Celulose	Hemicelulose	Lignina	compostos tóxicos	vantagens	Desvantagens
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Não há	Redução da cristalinidade	Alto consumo de energia
	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, com mudança da estrutura	Alta formação	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	Hidrotérmico	Diminuição do grau de cristalinidade e aumento do tamanho dos poros da celulose.	Alta solubilização	Pouca remoção, com moderada transformação na estrutura	Baixa formação	Não requer catalisadores, e reatores são de baixo custo	Altos consumos de água e energia
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção,com mudança na estrutura	Baixa formação	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Baixa formação	Remoção efetiva de ésteres	Regente caro, recuperação alcalina
	Organosolve	Considerável inchação	Solubilização significativa, quase completa	Solubilização significativa pode ser quase completa	Média/baixa formação	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente, técnica relativamente cara
	AFEX*	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Baixa formação	Menores perdas de xilanas	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~ 40% de deslignificação	Sem formação a baixa formação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

Tabela 3: Sumário das diferentes tecnologias de pré-tratamento e as alterações que ocorrem nas características composicionais da biomassa lignocelulósica.

Fonte: (SANTOS et al., 2011; e TOMÁS-PEJÓ et al., 2011)* Explosão a vapor com amôni.

2.4.1. Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos não usam reagentes químicos, e incluem as técnicas de explosão a vapor, pré-tratamento hidrotérmico, mecânico, radiação de alta energia entre outros, sendo que os pré-tratamentos de explosão a vapor e hidrotérmico são os mais comuns e os mais utilizados (ZHENG *et al.*, 2009).

2.4.1.1. Explosão a vapor

Neste pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica é aquecida por vapor de água saturado em alta pressão. É um pré-tratamento hidrotérmico no qual a biomassa é submetida a vapor pressurizado por um período de tempo que pode ser de segundos a alguns minutos, e em seguida, ocorre uma despressurização súbita, com transformação da lignina e a hidrólise das hemiceluloses. Deve-se levar em conta o tamanho das partículas, temperatura, tempo de residência e a combinação entre o tempo e a temperatura. As principais desvantagens são a degradação parcial das hemiceluloses e a geração de alguns compostos tóxicos que podem afetar as etapas seguintes de hidrólise e fermentação. Os principais inibidores são os derivados de furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos. Entre os derivados de furano estão o furfural e o 5-hidroximetilfurfural que decorrem da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (ALVIRA *et al.*, 2010; WRIGHT, 1988 *apud* ZHENG *et al.*, 2009; EXCOFFIER *et al.*, 1991 *apud* ZHENG *et al.*, 2009).

2.4.1.2. Hidrotérmico

No pré-tratamento hidrotérmico, a pressão é utilizada para manter a água no estado líquido em temperaturas elevadas que atingem até aproximadamente 200°C (PIENKOS & ZHANG, 2009; ZHENG *et al.*, 2009). Neste pré-tratamento, a biomassa sofre um processo de cozimento em água a alta temperatura e alta pressão, onde ocorrem melhor digestibilidade da celulose, melhor extração do açúcar, facilidade para recuperar pentoses, com a vantagem de produzir um pré-hidrolisado contendo pouco inibidor na fase de fermentação do açúcar (ZHENG *et al.*, 2009). Algumas biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar, palhas de milho, trigo e

cevadas que passaram pelo tratamento hidrotérmico apresentaram hidrólise das hemiceluloses entre 80-100%, que resultou rendimento de xilose entre 45-65% (SUN & CHENG, 2002; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008 *apud* MTUI, 2009).

O pré-tratamento hidrotérmico não necessita de neutralização dos fluxos líquidos e condicionamento de produtos químicos, desde que um ácido não seja adicionado como catalisador (MOSIER *et al.*, 2005 *apud* ZHENG *et al.*, 2009; NEGRO *et al.*, 1996 *apud* ZHENG *et al.*, 2009; PEREZ *et al.*, 2007 *apud* ZHENG *et al.*, 2009). Além disso, não é exigida uma redução do tamanho da biomassa, porque as partículas são quebradas durante o pré-tratamento, o que chama a atenção para a aplicação em grandes escalas (ZHENG *et al.*, 2009). Durante o processo do pré-tratamento hidrotérmico, há a produção de ácido acético e outros ácidos orgânicos que ajudam a catalisar a hidrólise; primeiramente de polissacarídeos, tais como as hemiceluloses, em oligossacarídeos solúveis, e em seguida, açúcares monoméricos. Em condições ácidas, estes açúcares monoméricos são parcialmente degradados para aldeídos como furfural e 5-HMF que agem como inibidores para microorganismos na fase de fermentação dos açúcares. Ainda, a água quente tem uma constante dielétrica elevada e assim permite dissolver quase que toda hemiceluloses, liberando açúcares e ácidos (ANTAL, 1996 *apud* ZHENG *et al.*, 2009).

Para evitar a formação de inibidores, o pH deve ser mantido entre 4 e 7 durante todo o pré-tratamento, pois nesta faixa de pH, os açúcares hemicelulósicos são retidos na forma oligomérica e a formação de monômeros é minimizada, havendo, então, menor degradação de produtos (MOSIER *et al*, 2005). E geral os pré-tratamentos hidrotérmicos são atraentes por potencial redução de custos, como: nenhuma exigência de catalisadores e baixo custo na construção de reatores por não ocorrer corrosão. Tem também a vantagem de que os produtos da solubilização das hemiceluloses e lignina estão em concentrações baixas devido à grande quantidade de água, consequentemente a concentração dos produtos da degradação se encontrará reduzida. No entanto, a quantidade de água requerida no processo, assim como a de energia, são bem elevadas (ALVIRA *et al.*, 2010).

19

2.4.1.3. Pré-tratamento mecânico

Os processos mecânicos provocam a redução do tamanho das partículas e a cristalinidade dos materiais lignocelulósicos para que ocorra um aumento da área superficial e se reduza o grau de polimerização dos materiais. Para esse processo são empregados métodos como retificação e moagem dos resíduos ou ainda a combinação de ambos, tudo dependendo do tamanho final da partícula que se deseja (ALVIRA *et al.*, 2010). Porém, a energia requerida para esses processos é alta e dependente das características dos materiais utilizados, inviabilizando economicamente esse processo.

2.4.2. Pré-tratamentos químicos

Existem diversas categorias desse pré-tratamento, e eles têm como principal objetivo melhorar a digestibilidade da celulose através da remoção de lignina e/ou hemicelulose e em menor nível, diminuir o grau de polimerização do componente de celulose. Dentre os principais pré-tratamentos químicos, destacam-se os pré-tratamentos ácidos, alcalinos, os pré-tratamentos de explosão a vapor catalisados, AFEX, organosolve e pré-tratamento com líquidos iônicos (ZHENG *et al.*,2009).

2.4.2.1. Pré-tratamento ácido

O principal objetivo desse pré-tratamento é solubilizar a fração de hemiceluloses da biomassa lignocelulósica e tornar a celulose mais acessível às enzimas. Nesse pré-tratamento utiliza-se ácido concentrado ou ácido diluído, porém a utilização de ácidos concentrados não é atrativa para a produção de bioetanol devido à maior formação de compostos inibitórios na fase de fermentação dos açúcares, além de provocar corrosão nos equipamentos, tornando a técnica menos atrativa industrialmente (ALVIRA *et al.*, 2010; WYMAN, 1996).

A técnica que faz uso de ácido diluído aparenta ser um método mais favorável para aplicações industriais e pode ser aplicada em altas temperaturas (~180°C) durante períodos mais curtos de tempo; ou em temperaturas mais baixas (~120°C) para um espaço de tempo maior (30 a 90 minutos). No entanto, dependendo da temperatura do processo, alguns compostos da

degradação de açúcares, tais como furfural e 5-hidroximetilfurfural, além de compostos aromáticos da degradação de lignina, são detectados e podem afetar o metabolismo dos microorganismos no processo de fermentação (SAHA *et al*, 2005; ALVIRA *et al.*, 2010).

Alguns estudos de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído mostram bons rendimentos. Saha *et al.* (2005) teve rendimento de sacarificação de 74% utilizando 0,74% v/v de H_2SO_4 a 121°C durante 1h na palha de trigo.

2.4.2.2. Organosolve

É um método de pré-tratamento promissor, onde inúmeras misturas aquosas com solventes orgânicos podem ser utilizadas, incluindo metanol, etanol, acetona, etileno glicol e álcool tetra-hidrofurfurílico em uma faixa de temperatura entre 150-200°C a fim de solubilizar a lignina e proporcionar celulose para o ataque enzimático na hidrólise (ZHAO *et al*, 2009 *apud* ALVIRA *et al.*, 2011). Em alguns estudos, estas misturas são combinadas com catalisadores ácidos (HCL, H₂SO₄, oxálico ou salicílico) para quebrar as ligações das hemiceluloses e obter um maior rendimento de xilose. No entanto, a adição de ácido pode ser evitada quando se aumenta a temperatura (acima de 185°C) obtendo uma deslignificação satisfatória (ZHENG *et al.*, 2009).

O pré-tratamento organosolve produz substrato de celulose altamente digerível para quase todos os tipos de matérias-primas, e lignina com potencial de alto valor para utilização após ser recuperada da etapa de pré-tratamento. Outro benefício é que o pré-tratamento organosolve, removendo a lignina, minimiza os problemas de adsorção das enzimas celulolíticas à lignina, refletindo em menores dosagens das enzimas. Um dos inconvenientes é a produção significativa de furfural, HMF e fenóis da decomposição da lignina no pré-hidrolisado obtido do pré-tratamento (GÍRIO *et al.*, 2010, ZHU & PAN, 2010 *apud* ALVIRA *et al.*, 2011). Pasquini *et al.* (2005), citado por Mesa *et al.* (2010), mostraram alta eficiência na remoção de lignina a partir da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar com dióxido de carbono em elevadas pressões (supercrítico) na presença da mistura de etanol-água como co-solvente.

A remoção dos solventes do sistema é necessária e se faz a partir de técnicas apropriadas de extração e separação, como por exemplo, a evaporação e condensação. Os solventes devem ser reciclados para reduzir os custos operacionais (SUN & CHENG, 2002), já que esses têm um elevado preço comercial e refletem nas aplicações industriais. Os alcoóis como metanol e etanol,

por terem baixo peso molecular e baixo ponto de ebulição são os mais favorecidos (ALVIRA *et al.*, 2010). Entretanto, o pré-tratamento organosolve com etanol comparado com metanol é mais seguro e vantajoso, pois o etanol é menos tóxico que o metanol e tem baixo custo, com condições operacionais favoráveis (baixo ponto de ebulição, co-geração), facilitando a recuperação deste por processos de separação (ZHAO *et al.*, 2009).

2.4.2.3. Explosão a vapor catalisada

O pré-tratamento de explosão a vapor catalisada é bem parecido com o pré-tratamento de explosão a vapor não catalisada no que se refere ao modo de ação, exceto que alguns reagentes químicos, incluindo SO₂, H₂SO₄, CO₂, entre outros são usados como catalisadores para impregnar a biomassa antes do pré-tratamento. Comparando esse método com o método de explosão a vapor não catalisada, é observada maior remoção de hemiceluloses (ZHENG *et al.*, 2009). Entretanto, essa técnica também gera alguns compostos inibitórios derivados a partir da degradação de carboidratos, e então certas estratégias de destoxificação podem ser necessárias para não prejudicar os demais processos. Outras limitações também aparecem, como a destruição parcial da fração de xilana e rupturas incompletas da matriz lignina-carboidrato (ZHENG *et al.*, 2009).

2.4.2.4. Oxidação úmida

A oxidação úmida é outro subtipo dos pré-tratamentos físico-químicos. Este é um prétratamento oxidativo que emprega oxigênio ou ar como catalisador. A oxidação ocorre em temperaturas entre 170-200°C e pressão entre 10 e 12 bar. Nesse processo, baixa formação de inibidores e remoção eficiente de lignina foram reportados, mas por outro lado o custo do oxigênio e outros catalisadores são considerados uma das principais desvantagens para o processo de oxidação úmida (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.4.2.5. Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é uma das principais tecnologias dentre as técnicas do prétratamento químico. Ele emprega várias bases e agentes oxidantes, incluindo hidróxido de sódio (SILVERSTEIN et al., 2007 apud ZHENG et al., 2009; CARRILLO et al., 2005 apud ZHENG et al., 2009), hidróxido de cálcio (CHANG et al., 2001 apud ZHENG et al., 2009; FUENTES, 2009; RABELO, 2010; AYALA, 2012), hidróxido de potássio (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000 apud ZHENG et al., 2009), amônia líquida (KIM et al., 2003 apud ZHENG et al., 2009), hidróxido de sódio em combinação com peróxido de hidrogênio (SAHA & COTTA, 2007 apud ZHENG et al., 2009; RABELO et al., 2011; AYALA, 2012), entre outras. O pré-tratamento alcalino compreende basicamente o processo de deslignificação, onde certa quantidade de hemiceluloses também são solubilizadas, deixando na biomassa a celulose mais acessível ao ataque enzimático (KRISTENSEN, 2008; ZHENG et al., 2009).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos causa inchaço, levando a diminuição do grau de polimerização, aumento da área da superfície interna, perturbações na estrutura da lignina e a separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos (FAN *et al.*, 1987 *apud* ZHENG *et al.*, 2009).

Outro exemplo é o pré-tratamento alcalino com reagentes oxidativos, onde são adicionados à biomassa componentes oxidativos como o peróxido de hidrogênio ressuspendido em água em combinação com bases como, por exemplo, o hidróxido de sódio. Muitas reações podem ocorrer durante esse pré-tratamento, tais como, substituição eletrofílica, deslocamento das cadeias laterais, clivagem oxidativa de núcleos aromáticos, dentre outras reações como a formação de compostos inibidores devido a lignina ser oxidada gerando a formação de compostos aromáticos (HENDRICKS & ZEEMAN, 2009).

Em comparação com outros pré-tratamentos, o alcalino usa temperaturas e pressões mais baixas e até mesmo condição ambiente. O tempo do pré-tratamento, no entanto, pode ser maior, em torno de horas e até dias. A desvantagem mais significativa é a conversão dos álcalis em sais não recuperáveis e/ou a incorporação dos mesmos na biomassa, tornando o pré-tratamento desafiador em certas ocasiões (ZHENG *et al.*, 2009).

23

2.4.2.6. AFEX

O pré-tratamento AFEX é similar ao de explosão a vapor. No AFEX, a biomassa é exposta a um líquido quente de sal amoníaco, sob alta pressão, onde a reação após certo período de tempo é despressurizada. A rápida liberação da pressão é que abre a estrutura lignocelulósica da biomassa, aumentando a digestibilidade dessa. Esse método, além de deslignificar, também solubiliza algumas hemiceluloses presentes na biomassa, porém essa solubilização não é comparada com a solubilização de outros métodos como o método de explosão a vapor catalisada (ZHENG *et al.*, 2009).

2.4.3. Pré-tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico emprega micro-organismos como fungos e bactérias que degradam madeira para modificar a estrutura dos materiais lignocelulósicos. Os fungos apresentam características distintas para a degradação lignocelulósica, o fungo da podridão branca, por exemplo, ataca principalmente a lignina, enquanto o da podridão marrom ataca a celulose e em menor teor a lignina (SCHURZ, 1978 *apud* ZHENG *et al.*, 2009). Logo, os fungos da podridão branca são considerados os mais promissores para o pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica.

O pré-tratamento biológico aparenta ser uma técnica promissora e com vantagens, como o não uso de reagentes químicos e baixo requerimento de energia (ZHENG *et al.*, 2009). No entanto, as desvantagens também são evidentes, como a lentidão do pré-tratamento, o controle cuidadoso do crescimento dos micro-organismos, além dos micro-organismos não consumirem somente a lignina, mas também a celulose e hemicelulose (ZHENG *et al.*, 2009).

2.5-Hidrólise

Nas últimas décadas, muitas pesquisas são direcionadas para a conversão de materiais lignocelulósicos a etanol (SUN & CHENG, 2002; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008, MANSFIELD & MEDER, 2003). A conversão inclui três etapas: o pré-tratamento, a hidrólise da celulose para a produção de açúcares fermentescíveis, e a fermentação dos açúcares para a produção do etanol. Essa conversão da celulose obtida do pré-tratamento de materiais

lignocelulósicos a glicose, pode ser realizada por duas vias distintas, usando ácidos ou enzimas (PRASAD *et al.*, 2007).

2.5.1. Hidrólise Ácida

Na hidrólise ácida, ácidos concentrados ou diluídos podem ser utilizados. Quando a hidrólise ácida diluída é a escolhida, ácidos como H_2SO_4 e HCL são usados, a temperatura é mais severa (200-240°C), e o rendimento para glicose é de aproximadamente 50% (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; CARDONA *et al.*, 2010; HAMELINCK *et al.*, 2005).

O processo de hidrólise com ácido concentrado tem um rendimento de 90% de glicose e é relativamente rápido (10-12min), faz uso de 30-70% de H_2SO_4 e apresenta pouca degradação. Entretanto, é um processo inviável economicamente e ambientalmente devido a problemas com a recuperação do ácido e corrosão dos equipamentos (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; HAMELINCK *et al.*, 2005).

2.5.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é promovida por enzimas microbianas celulolíticas, as quais são altamente específicas ao substrato (PRASAD *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2010) e tem demonstrado melhores resultados quando comparada com a hidrólise ácida, pois não apresenta na etapa da fermentação, componentes formados da degradação da glicose, embora o processo seja mais lento (PRASAD *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2010). Os principais produtos da hidrólise enzimática da celulose são os açúcares redutores, principalmente a glicose, que serão utilizados na etapa de fermentação. O processo da hidrólise é geralmente conduzido em condições moderadas (pH 4,6 e temperatura de 45-50°C) e não apresenta problemas de corrosão nos equipamentos, o que o torna um processo promissor quando comparado a hidrólise ácida (DUFF & MURRAY, 1996; LYND *et al.*, 1996). Como a celulose presente nos materiais lignocelulósicos é composta por componentes cristalinos e amorfos, cada um deles apresenta digestibilidades diferentes frente ao ataque enzimático na hidrólise. A área superficial está entre as características estruturais que mais afetam a susceptibilidade da celulose na hidrólise

enzimática (RAMOS *et al.*, 1993; WALKER & WILSON, 1991). Outras características também importantes são a umidade, o arranjo molecular da celulose e a presença de outros materiais como a lignina (GAN *et al.*, 2003).

2.5.2.1. As enzimas do complexo celulolítico

Celulase refere-se a um grupo de enzimas denominadas hidrolases que contribuem na degradação da celulose em glicose, por meio de clivagens das ligações *O*-glicosídicas. A maioria dos organismos celulolíticos apresenta vários componentes de celulase, formando um complexo que atua sinergicamente na hidrólise de substratos celulósicos. A natureza do sistema enzimático celulolítico é que determina o modo de ação da celulase, a atividade de cada um dos componentes, a ação sinérgica entre os componentes enzimáticos e o efeito inibitório do produto e da reação sobre a ação enzimática (GAN *et al.*, 2003).

Os sistemas celulolíticos mais investigados são aqueles extraídos a partir de fungos, tais como Trichoderma viride, Trichoderma reesei, e Fusarium solani (KLYOSOV & RABINOWITCH, 1980). As celulases fúngicas compreendem na maioria das vezes um sistema enzimático complexo que consiste de quatro enzimas. Essas enzimas são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, e são divididas em três grupos: endoglucanases (EnG, 1,4-β-D-glucana-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases ou celobiohidrolases (ExG/CBH, 1-4-β-D-glucana-celobio-hidrolase, EC 3.2.1.91), que são constituídas por celobiohidrolases que atuam na região externa da celulose e são divididas em dois tipos: enzima do tipo I (CBHI), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBHII) hidrolisa terminais não redutores; e por glucano hidrolases (GH), também conhecidas como 1,4-β-D-glucano-hidrolases que são capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulósica; e β -glicosidases (BG, β -glicosídeo gluco-hidrolase, EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO & PEREIRA Jr., 2010; FAN & LEE, 1983 apud GAN et al., 2003).

A endoglicanase é a celulase que inicia a hidrólise, ela hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica liberando vários oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização (GP), a exoglicanase (celobiohidrolase) atua nas extremidades redutoras e não redutoras dos oligossacarídeos, formando principalmente moléculas de celobiose.

O terceiro grupo, a β -glicosidase hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (CASTRO & PEREIRA Jr, 2010). A eficiência da hidrólise enzimática do material celulósico não depende somente da presença da celulose, mas também da proporção dos vários outros componentes como a lignina e as hemiceluloses (GREGG & SADDLER, 1996). Além dos três grupos principais das enzimas celulases, existe também um grupo de enzimas auxiliares que atacam as hemiceluloses, como as glucomanases, xilanases, β -xilosidases, galactomanases, entre outras (DUFF & MURRAY, 1996).

As enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor quando atuam conjuntamente do que quando atuam isoladamente uma das outras. Tal efeito é denominado sinergia. A Figura 8 ilustra a ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da fibra celulósica. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (HEIDORNE *et al.*, 2006): sinergia endoglucanase-exoglucanase: a endoglucanase disponibilisa terminais redutores e não redutores para a atuação de CBHI e CBHII, respectivamente; sinergia exoglucanase-exoglucanase-as CBHI e CBHII atuam conjuntamente nos terminais liberados pela hidrólise realizada pelas endoglucanases; sinergias exoglucanase- β -glicosidase e endoglucanases, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase.



Figura 8: Figura da atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da celulose. Fonte: (adaptado de CASTRO & PEREIRA Jr, 2010).

Apesar das enzimas celulolíticas serem divididas em três grupos diferentes, algumas características em comum são reportadas. A maioria das endoglucanases e celobiohidrolases de

micro-organismos celulolíticos possui um domínio de ligação à celulose (CBD – cellulose binding domain) que é ligado ao domínio catalítico por um peptídeo de ligação flexível. O CBD apresenta especificidade de ligação pela superfície da celulose cristalina e enfraquece as ligações de hidrogênio das microfibrilas de celulose vizinhas. As enzimas que possuem o CBD apresentam maior atividade sobre substratos sólidos, principalmente sobre celulose cristalina, mas não têm sua atividade afetada em substratos solúveis (ITO *et al.*, 2004; SANDGREN *et al.*, 2005). A Figura 9 ilustra a ação do CBD de celulose sobre a fibra de celulose.



Figura 9: Figura da interação entre o domínio catalítico de ligação da celulose (CBD) e a superfície da celulose. Fonte: (SciDAC, 2010).

2.5.2.2. Mecanismo de catálise da celulase

A reação de hidrólise enzimática catalisada pela celulase é caracterizada inicialmente como uma reação heterogênea, que é composta por um reagente insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzimas) (GAN *et al.*, 2003). Além da hidrólise enzimática ser lenta, existem fatores que a afetam; eles incluem as características do substrato, atividades das celulases, e as condições da reação (temperatura, pH, entre outros parâmetros) (SUN & CHENG, 2002).

A concentração do substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento e a taxa inicial da hidrólise enzimática da celulose. Em baixa concentração de substrato, o rendimento da hidrólise é sempre satisfatório (CHEUNG & ANDERSON, 1997 *apud* SUN & CHENG, 2002). Contudo, a concentração elevada de substrato pode causar inibição pelo substrato, o que reduz a

taxa da hidrólise; a extensão da inibição pelo substrato vai depender da razão substrato total/enzima total (HUANG & PENNER, 1991; PENNER & LIAW, 1994 *apud* SUN & CHENG, 2002). Além disso, existe o fato de que a susceptibilidade da enzima celulase ao substrato celulósico depende das características estruturais do substrato, que incluem a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área superficial e o conteúdo de lignina (McMILLAN, 1994).

Aumentar a carga de celulases em geral aumenta o rendimento até um certo ponto, mas também aumenta significantemente o custo do processo. A hidrólise enzimática da celulose consiste de três etapas: adsorção das enzimas celulases na superfície da celulose, a biodegradação da celulose em açúcares fermentescíveis e a dessorção das celulases. A adsorção da celulase sobre o material celulósico insolúvel pode ser descrita como irreversível (KRAULIS *et al.*, 1989 *apud* GAN *et al.*, 2003), reversível (MOONEY *et al.*, 1999 *apud* GAN *et al.*, 2003), ou semi-reversível (DEEBLE & LEE, 1985 *apud* GAN *et al.*, 2003). Alguns sugerem que a celulase adsorve sobre a superfície da celulose e promove uma série de ações catalíticas enquanto se move ao longo do substrato (SINITSYN *et al.*, 1989 *apud* GAN *et al.*, 2003). A atividade da celulase sofre uma diminuição durante o decorrer do processo de hidrólise, sendo um dos principais fatores a adsorção irreversível da celulase na lignina e celulose causando a sua desativação (CONVERSE *et al.*, 1988). Medve *et al.* (1997) observaram que ocorre adsorção de enzimas ao resíduo da hidrólise, levando a perda das enzimas, enquanto Boussaid e Saddler (1999) observaram que uma hidrólise completa do material é necessária para conseguir liberação efetiva das enzimas cenzimas cenzimas cenzimas.

Sabe-se que as enzimas celulases são inibidas pela celobiose e em menor grau pela glicose. O padrão desta inibição tem sido investigado ao longo do tempo e apresenta diferentes pontos de vista quanto à sua natureza. Ghose (1971) e Gregg e Saddler (1996) sugerem que a inibição competitiva é a que prevalece, já Holtzapple *et al.* (1984) argumentaram que a inibição não competitiva foi a dominante, enquanto Gusakov e Sinitsyn (1992) relataram a combinação de ambas inibições.

Kastel'Yanos *et al.* (1995) citado por Gan *et al.* (2003) descobriram que a glicose inibiu a celobiase, a celobiose inibiu endoglucanase, enquanto a exoglucanase não apresentou inibição por produtos finais. Quando glicose foi adicionada à mistura da reação no começo da hidrólise enzimática, a taxa e o grau da mesma diminuíram. Além disso, na presença de celobiose, a taxa

inicial de produção da glicose foi menor. Holtzapple *et al.* (1984) citados por Gun *et al.* (2003) informaram que todas as formas das espécies enzimáticas (livre, adsorvida e complexada) no processo de hidrólise da celulose foram sujeitas a inibição. Em seus estudos sobre celulases de *T. reesei*, descobriram que este sistema celulolítico foi inibido não competitivamente por açúcares redutores e foi menos susceptível a inibição por produto final do que as enzimas celulases produzidas pelos micro-organismos *Thermonospora* e *T. longibrachiatum*.

2.6. Processo de adsorção de moléculas

A adsorção é um processo onde moléculas de uma fase gasosa ou de uma solução ligamse em uma camada condensada de uma superfície sólida ou líquida. As moléculas que se ligam nas superfícies são chamadas de adsorbatos, enquanto que as substâncias que detém os adsorbatos são chamadas de adsorventes (MASEL, 1951). A remoção dessas moléculas da superfície é denominada dessorção.

A adsorção é considerada um processo de separação e, quando comparada com outras operações, apresenta um baixo consumo de energia. É também uma das principais etapas na catálise heterogênea, pois é através da formação de novas estruturas, resultantes da adsorção das moléculas do meio sobre o catalisador, que ocorrem as modificações nos mecanismos de reação que levam a reações de menores energias de ativação (GOMIDE, 1987).

As interações entre superfícies adsorventes e espécies adsorvidas podem ser tanto de natureza química quanto física (PARFITT & ROCHESTER, 1983). Logo, a adsorção pode ser um processo de natureza física ou química, baseando-se na força que as unem. A adsorção física (fisissorção) é causada principalmente por forças de Van der Waals ou forças eletrostáticas como as de dipolo entre as moléculas do adsorbato e os átomos que compõem a superfície do adsorvente, ou seja, as moléculas encontram-se fracamente ligadas à superfície e os calores de adsorção são baixos. Normalmente, a adsorção física ocorre a baixas temperaturas, rapidamente, e é reversível (RUTHVEN, 1984).

Na adsorção química, ou quimissorção, há o envolvimento de interações químicas entre o fluido adsorvido e o sólido adsorvente, onde há a transferência de elétrons, equivalente à formação de ligações químicas entre o adsorbato e a superfície do sólido, as forças de ligação são de natureza covalente ou até iônica. Ocorre uma ligação química entre a molécula do meio e a do

sólido, o que altera a estrutura eletrônica da molécula quimissorvida, tornando-a extremamente reativa (FOGLER, 1999). Neste caso, o calor de adsorção é da mesma ordem de grandeza dos calores de reações químicas. Na adsorção física podem formar-se camadas moleculares sobrepostas, enquanto que na adsorção química se forma uma única camada molecular adsorvida (monocamada) (RUTHVEN, 1984).

Vários fatores afetam a adsorção, tais como a estrutura molecular, tamanho da partícula do material adsorvente, a solubilidade do adsorbato, o pH do meio, o tempo de contato e a temperatura. Além disso, a rede de interação entre molécula adsorvida e superfície pode envolver mais do que um tipo de interação, dependendo da estrutura química de ambos componentes (PARFITT & ROCHESTER, 1983).

2.6.2. Isotermas de adsorção

A abordagem mais favorecida para uma investigação do mecanismo de adsorção é um estudo da isoterma. A isoterma de adsorção é a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes a uma dada temperatura. Para líquidos, a concentração usualmente é expressa em unidade de massa, como em parte por milhão (ppm). A concentração do adsorvato no sólido é expressa como massa de adsorvato por unidade de massa de adsorvente (MCCABE *et al.*, 1993). As isotermas de adsorção são curvas extremamente úteis, pois indicam a forma como o soluto adsorverá efetivamente no adsorvente; fornece uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá entre outras características relevantes (MORENO-CASTILLHA, 2004). Alguns aspectos importantes devem ser considerados em uma isoterma: (a) a taxa de adsorção; (b) a forma da isoterma; (c) o significado do platô encontrado nas isotermas; (d) a extensão da adsorção; (e) se a adsorção é monomolecular ou se estende ao longo de muitas camadas; (f) a orientação das moléculas adsorvidas; (g) o efeito da temperatura; e (h) a natureza das interações entre adsorbato e adsorvente (PARFITT & ROCHESTER, 1983).

Existe uma variedade de tipos e classificações de isotermas, porém uma das classificações de isoterma de adsorção mais usada e detalhada é a de Giles *et al.* (1960), como mostra a Figura 10. As isotermas são divididas em quatro classes {S, L, H, e C} e quatro subgrupos {1, 2, 3 e 4}.



Figura 10: *C representa a concentração de soluto em solução e ω representa a quantidade adsorvida por quantidade de adsorvente. Classificação das isotermas de Giles *et al.*, (1970).

As isotermas da classe S (sigmoidal) apresentam uma curvatura inicial voltada para cima, pois as interações, adsorvente - adsorbato são mais fracas que as interações adsorbato - adsorbato e solvente - adsorvente.

As isotermas da classe L (de Langmuir) possuem curvatura inicial voltada para baixo estilo côncava ao eixo da concentração, o que indica a alta afinidade relativa do adsorvente pelo soluto a baixas concentrações e a diminuição da superfície livre do adsorvente devido à diminuição da disponibilidade dos sítios ativos.

As isotermas da classe H ("high affinity") apresentam uma inclinação inicial muito grande seguida por uma região quase horizontal, essas isotermas aparecem quando o adsorbato tem grande afinidade pelo adsorvente.

As isotermas da classe C ('constant partition') possuem um início linear indicando que o número de sítios ativos é constante. O tipo C ocorre em sistema em que o soluto é adsorvido mais rapidamente que o solvente.

Os subgrupos são caracterizados como segue: Subgrupo 2 - Indica a saturação da superfície em que o adsorbato tem mais afinidade pelo solvente do que pelas moléculas já adsorvidas. Subgrupo 3 - a isoterma é caracterizada por uma subida após um ponto de inflexão. Subgrupo 4 - Indica a formação de camadas múltiplas de adsorbato adsorvido. Subgrupo mx - A isoterma apresenta um máximo a altas concentrações. É um caso raro e indica que em altas concentrações do adsorbato as interações adsorbato - adsorbato aumentam mais rapidamente do que as interações adsorbato – adsorvente (GILES *et al.*, 1960)

2.7. Considerações da transferência de massa na hidrólise enzimática de materiais celulósicos

Desde que, a celulose é um substrato insolúvel e as enzimas celulase e β -glicosidase são catalisadores solúveis, a hidrólise enzimática é um processo catalítico heterogêneo, e pode ser dividido em duas etapas principais (KIRCHMAN *et al.*, 1989):

- Reações externas que ocorrem no exterior das partículas
- Reações internas que ocorrem dentro dos poros das partículas.

Na Tabela 4, estão descritos os sete principais passos envolvidos na hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos (ZHENG, 2007; KIRCHMAN *et al.*, 1989).

Passos	Descrições			
1	Transferência de massa das enzimas na fase líquida para a superfície externa das partículas			
	do substrato.			
2	Adsorção das enzimas à superfície das partículas e adsorção inespecífica na lignina.			
3	Formação do complexo enzima-substrato.			
4	Reação sobre a superfície do substrato, com liberação do produto e da enzima.			
5	Degradação da superfície da celulose promovida pela ação das enzimas.			
6	Transferência de massa dos produtos da reação e/ou enzimas da superfície externa da			
	partícula para a parte líquida da reação.			
7	Hidrólise dos oligômeros solúveis para glicose pelas β -glicosidases na fase aquosa.			

Tabela 4: Principais passos da hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos.

O estágio inicial da reação de hidrólise começa pela difusão externa das enzimas através de uma camada fina de líquido estagnada ao redor do substrato. A enzima difundida adsorve na superfície do substrato e começa a reação catalítica. No estágio inicial da reação de hidrólise na superfície exterior da partícula, a enzima adsorve rapidamente na superfície externa da celulose e também na lignina, mesmo que inespecificamente. Na celulose, a enzima ocupa alguns dos sítios acessíveis da superfície do substrato. Com o progresso da reação, as partículas de celulose se reduzem, e, consequentemente, o número de sítios ativos disponíveis também é menor. Isso continua até que todos os sítios ativos estejam ocupados e toda a superfície do substrato esteja coberta completamente por complexos enzima-substrato, sejam eles estáveis ou inativados (KIRCHMAN *et al.*, 1989).

Além da reação externa à superfície, a enzima penetra dentro do substrato poroso e promove a reação no interior das partículas, causando mudanças estruturais no substrato (KIRCHMAN *et al.*, 1989).

Um regime de agitação intenso na reação de hidrólise pode reduzir a resistência à transferência de massa, acelerando todo o processo hidrolítico. No entanto, essa agitação pode ocasionar desativação quando as enzimas são expostas a uma tensão na zona de reação. Gan *et al.* (2003) introduziram um parâmetro nomeado "tempo de residência de cisalhamento" para explicar a desativação da celulase pela força do cisalhamento no processo em seu modelo matemático. No entanto, as suas simulações e experiências mostraram que, na maioria dos casos práticos, a tensão

34

tangencial no reator não é alta o suficiente para causar danos significativos na enzima (KIRCHMAN *et al.*, 1989).

2.8. Adsorção de celulase e β-glicosidase em substratos celulósicos

Para entender a hidrólise enzimática da celulose de biomassas lignocelulósicas prétratadas, é essencial investigar a adsorção das enzimas celulolíticas nos componentes de toda a biomassa (celulose, lignina e hemiceluloses) (ZHENG, 2007). A adsorção das enzimas celulases em celulose pura e tipos diferentes de biomassa lignocelulósica tem sido estudada para a determinação de parâmetros que controlam as taxas da hidrólise enzimática e para empregá-los de modo a se obter condições mais favoráveis e eficientes na conversão da biomassa a açúcares solúveis. Os pesquisadores Girard e Converce (1993) e Deshpande e Eriksson (1984) relataram que os componentes das celulases adsorvem em isolados de lignina e nos resíduos da hidrólise.

Lee *et al.* (1982) e Lee e Fan (1982) mostraram que as taxas iniciais de hidrólise são proporcionais à quantidade de enzima adsorvida inicialmente. Klyosovo (1990) trabalhou com vinte e seis diferentes preparações de celulases, sendo dez delas altamente purificadas, e mostrou uma forte correlação entre a taxa de hidrólise e valores da constante de equilíbrio da adsorção.

A maioria das pesquisas de adsorção é baseada em celulose pura e, para que a hidrólise da celulose não afete a reação, os ensaios de adsorção são realizados na maioria das vezes em temperaturas baixas (0 a 10°C), já que em temperaturas mais elevadas, normalmente superiores a 10°C, ocorre a dessorção das enzimas devido à solubilização da celulose, tornando difícil o equilíbrio de adsorção (STEINER *et al.*, 1988).

As enzimas podem ligar-se especificamente ou não em superfícies sólidas. As interações são na maioria das vezes não covalentes, como as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Outras proteínas adsorvidas, como as de baixa massa molecular, na região interfacial, também podem afetar a adsorção enzimática (PALONEN *et al.*, 2004).

REINKAINEN *et al.* (1995) *apud* PALONEN *et al.*(2004) apresentaram que as celulases de *T. reesei* possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície; assim, esse resíduos podem interagir com a superfície hidrofóbica da lignina, causando a adsorção improdutiva das celulases com a desativação das mesmas, reduzindo a eficiência do processo catalítico (PALONEN *et al.*, 2004; YANG & WYMAN 2006; BORJESSON *et al.*, 2007). Por

35

isso, a adsorção improdutiva da celulase no conteúdo da lignina deveria ser considerada ao se desenvolver uma isoterma de adsorção.

Peitersen *et al.* (1977) foi o primeiro que sugeriu a relação entre enzima livre e adsorvida, que é descrita por isotermas de adsorção. A partir de então, a descrição mais comum para a adsorção de enzimas do sistema celulolítico é a isoterma de Langmuir (Equação 2.1), onde a adsorção é dada por uma constante de equlíbrio e por uma constante que representa a máxima capacidade de adsorção da enzima no substrato. A isoterma de Langmuir é representada como:

$$E_{ad} = \frac{E_{\max}K_p E_f}{1 + K_p E_f} \tag{2.1}$$

Onde, E_{ad} é a enzima adsorvida (mg ou µmol de enzima/g de substrato); E_{max} é a adsorção máxima de enzima por g de substrato (mg ou µmol enzima/g substrato); E_f é a concentração de enzima livre (mg ou µmol enzima/mL); K_p é a constante de equilibrio da adsorção, que está relacionada com as forças de interação entre adsorbato e adsorvente (mL/mg ou µmol de enzima) (ZHENG, 2007).

Zhang e Lynd (2004) explicaram que a isoterma de Langmuir é bastante usada, pois proporciona, na maioria das vezes, um bom ajuste dos parâmetros, além de representar um modelo mecanístico simples que pode ser empregado para comparar as propriedades cinéticas de vários sistemas enzima-celulose. Muitos estudos de adsorção de celulases no qual a isoterma de Langmuir é usada são relatados. Alguns dos trabalhos estão listados na Tabela 5.

Micro- organismo	Celulase	Substrato	Temperatura (°C)	E _{max} mg/g (μmol/g)	K _p L/g (L/µmol)	Referências
T. reesei	Total	Avicel	4	55,6	3,21	OOSHIMA
						<i>et al.</i> (1983)
T. reesei	Total	Avicel	5	64	1,23	LEE, et al.
						(1982)
T. reesei	Total	Avicel	4	95,2	0,3	LU et al.
						(2002)

Tabela 5: Lista de alguns estudos da adsorção de celulase que usam a isoterma de Langmuir.

Fonte: Tabela adaptada de ZHENG (2007).

A isoterma de Langmuir irá apresentar parâmetros diferentes, pois esses variam de acordo com o coquetel enzimático utilizado, os componentes enzimáticos, a temperatura e os substratos.

Na tabela 5, observa-se que os valores dos parâmetros variam muito sob as mesmas condições experimentais, como os encontrados por Lee *et al.* (1982) Ooshima *et al.* (1983) e LU *et al.* (2002). Algumas suposições devem ser levadas em consideração para a utilização da isoterma de Langmuir, como a reversibilidade da adsorção, as não interações entre espécies adsorvidas, a homogeneidade nos sítios de ligação e a composição uniforme entre as celulases adsorvidas (ZHANG & LYND, 2004 *apud* BANSAL *et al*, 2009).

Na isoterma de Langmuir, para o cálculo da quantidade de enzima adsorvida durante a hidrólise, uma suposição implícita é que o equilíbrio de adsorção é estabelecido muito rápido, quando comparado com a reação da hidrólise enzimática (BANSAL *et al.*, 2009). De acordo com Steiner *et al.* (1988), essa hipótese não pode ser verdadeira para todas as condições experimentais. O tempo necessário para se atingir o equilíbrio de adsorção tem sido estimado entre 5-60 minutos para temperaturas entre 4°C e 25°C (KIM *et al.*, 1994; MEDVE *et al.*, 1998; MEDVE *et al.*, 1994). Além disso, a utilização das mesmas isotermas em todos os pontos de tempo durante a reação assume que as caracteríticas de adsorção do sistema enzima-substrato não mudam.

Fan e Lee (1983) e Steiner *et al.* (1988) verificaram, respectivamente, que a concentração de E_{ads} não aumentou com as conversões de celulose pura e substratos lignocelulósicos. Hong *et al.* (2007) trabalhando com Avicel mostrou que a quantidade máxima adsorvível de enzima (E_{max}) diminui com a conversão. Lignina e hemicelulose atuam como barreiras para as celulases que vão atingir o núcleo da celulose e com isso, as mudanças no processo de adsorção são mais pronunciadas para os substratos lignocelulósicos quando comparado com substrato de celulose pura. Por isso é interessante à comparação entre a cinética e a isoterma de adsorção das enzimas do complexo celulolítico em materiais lignocelulósicos e na celulose pura (Avicel).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Matéria-Prima

A matéria-prima de todos os experimentos foi o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) pré-tratado hidrotérmico e organossolve e a celulose microcristalina Avicel PH101, obtida da Sigma-Aldrich. O bagaço de cana-de-açúcar foi proveniente de uma mesma safra (2011/12) e fornecido pela Usina Tarumã do Grupo Raízen, localizada na cidade de Tarumã, Estado de São Paulo, obtido por colheita mecanizada da cana crua e resultante da última moenda após a extração do caldo. O bagaço de cana-de-açúcar foi seco a temperatura ambiente por quatro dias e armazenado em sacolas fechadas para posteriores análises.

3.2. Pré-tratamentos

Foram realizados dois pré-tratamentos diferentes ao bagaço de cana-de-açúcar, o hidrotérmico e o organossolve. Ambos pré-tratamentos foram conduzidos no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) pelo doutorando João Moreira Neto. A metodologia usada para cada pré-tratamento está detalhada a seguir, nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

3.2.1. Pré-tratamento hidrotérmico

O bagaço de cana integral foi submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em um reator de liga Alloy C-276 (liga níquel-molibdênio-cromo com adição de tungstênio) com capacidade de 7,5 L, marca Parr, modelo 4554. Adicionou-se ao reator 300 g de bagaço com 3L de água destilada mantendo a razão sólido-líquido de 1:10 (m/v). A reação ocorreu por 10 minutos a uma temperatura de 190°C. Após o tempo reacional, realizou-se o resfriamento do reator com fluxo de água e, então, o bagaço de cana seguiu para lavagem com água até pH neutro, para remoção dos resíduos de hemiceluloses e outros compostos presentes no hidrolisado; em seguida, o material

permaneceu em temperatura ambiente para secagem e foi guardado para as análises de caracterização química e adsorção.

3.2.2. Pré-tratamento organossolve

O bagaço de cana integral foi submetido ao pré-tratamento organossolve em um reator de liga Alloy C-276 (liga níquel-molibdênio-cromo com adição de tungstênio) com capacidade de 7,5 L, marca Parr, modelo 4554. Foram adicionados no reator 300 g de bagaço com 3L de uma solução água/etanol (1:2 v/v) mantendo a razão sólido-líquido de 1:10 (m/v). A reação ocorreu por 150 minutos a uma temperatura de 190°C. Após o tempo reacional, realizou-se o resfriamento do reator com fluxo de água. O bagaço de cana pré-tratado foi desfibrado com uma solução de NaOH 1% (m/v) para extração da lignina solubilizada e adsorvida nas fibras. O material desfibrado com a solução de NaOH 1% (m/v) partiu para lavagem com água até pH neutro, para remoção dos resíduos de hemiceluloses e outros compostos presentes no hidrolisado, e, em seguida, o material também permaneceu em temperatura ambiente para secagem e depois foi guardado para as análises de caracterização química e adsorção.

3.3. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química dos bagaços in natura e organossolve foi realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), conforme metodologia ainda não publicada, modificada junto ao Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL), a partir de Sluiter *et a.* (2008 a, b, c, d, e). A análise de composição química para o bagaço hidrotérmico foi conduzida no Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimaticos (LEPFE), na Unicamp. A caracterização compreendeu a análise de materiais, tais como: cinzas, extrativos, análise de carboidratos, lignina solúvel e insolúvel. É bom lembrar que a análise de extrativos foi conduzida apenas para o bagaço de cana integral, pois durante a etapa de pré-tratamento os extrativos são removidos da biomassa. Para a análise da composição química do bagaço, certa quantidade de bagaço pré-tratado passou por um moinho de facas (modelo MA – 630/1/E da marca Marconi, Brasil) até que o material estivesse com partículas inferiores a 0,5 mm, que foram selecionadas através de uma peneira de 20 mesh.

3.3.1 Teor de umidade

O teor de umidade do bagaço de cana foi determinado em analisador de umidade por infravermelho GEHAKA, (marca IV 2000, Brasil). Essa análise sempre foi realizada para que todos os resultados ficassem em termos de biomassa seca. Cerca de 5 g de bagaço foram colocados na balança, a qual é aquecida a 105°C. A balança mede a porcentagem de perda de massa que é relativa ao teor de umidade do bagaço. Todas as análises foram em triplicata.

O cálculo do teor de umidade em base úmida é dado pela Equação 3.1.

$$U \% = \frac{massa \ do \ bagaço \ úmido - massa \ do \ bagaço \ a.s.}{massa \ do \ bagaço \ úmido} x \ 100$$
(3.1)

Onde, U representa o teor de umidade do material e a.s. representa a massa absolutamente seca do material.

3.3.2. Determinação do teor de cinzas na biomassa

Para determinação da quantidade de cinzas na biomassa, foi adotado o procedimento do NREL "Determination of Ash in Biomass" (SLUITER, *et al.* 2005b). Nesta etapa, foram adicionados cerca de 1,00 g do material, descontando o teor de umidade nos cadinhos de porcelana já identificados e tarados na mufla (modelo Q-318D24 da marca Quimis) a 800°C por 2 horas. Em seguida, as amostras seguiram à mufla e foram calcinadas a 800°C por 2 horas. Terminado o processo de queima os cadinhos foram transferidos para um dessecador, e aproximadamente após 2 horas para que atingissem a temperatura ambiente, pesaram-se os cadinhos e os valores foram anotados. Realizaram-se as análises em triplicata.

O cálculo do teor de cinzas da biomassa é dado pela Equação 3.2.

% teor de cinzas=
$$\left(\frac{M_{cinza} - M_{cadinho}}{M_{C+B} - M_{cadinho}}\right) \times 100$$
 (3.2)

 M_{C+B} = massa do cadinho + massa do bagaço seco (g)

 $M_{cadinho}$ = massa do cadinho calcinado vazio (g)

M_{cinzas}= massa do cadinho com cinzas, (g)

3.3.3. Determinação do teor de carboidratos, lignina, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural na biomassa

Estas análises basearam-se nos procedimentos padrões do NREL "Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy" (HYMAN, *et al.*, 2007), "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass" (SLUITER, 2008) e no artigo "Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar" (GOUVEIA, *et al.* 2009). As concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, lignina (lignina solúvel e insolúvel), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural presentes nos hidrolisados foram analisados por HPLC (cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity HPLC Agilent Technologies com detector de índice de refração IR e DAD UV-vis, Alemanha). A metodologia adotada exigiu que o bagaço estivesse com umidade menor que 10% e livre de extrativos.

3.3.3.1. Hidrólise ácida

A biomassa, moída, peneirada e absolutamente seca foi pesada em aproximadamente 0,30 g para cada amostra de bagaço (M_1) em tubos de ensaio previamente identificados. Adicionou-se 3,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (m/m) em cada tubo, após, permaneceram encubados em banho termostático a 30°C por 1 hora onde eram agitados a cada 10 minutos a fim de que ocorresse uma hidrólise homogênea. Decorrido o tempo da hidrólise ácida, o conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para frascos SCHOTT de 250 mL com tampa, juntamente de 84 mL de água destilada. Preparou-se um "branco" com ácido sulfúrico e água destilada, também. As amostras seguiram para a autoclave (Autoclave vertical modelo AV 50 da marca Phoenix, Brasil) a 121 °C e 1,1 bar durante 1 h para a total hidrólise dos oligômeros formados. Com o término do processo de autoclavagem, os frascos permaneceram à temperatura ambiente para que fossem resfriados.

3.3.3.2. Determinação de Lignina Klason (insolúvel)

Os hidrolisados ácidos passaram por filtragem em funis de vidro com papéis de filtro devidamente secos e pesados (M₂). As frações líquidas foram filtradas para quantificação da lignina solúvel, carboidratos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Os papéis de filtro com os sólidos retidos passaram por lavagem com água destilada, aproximadamente 1,5 L para total retirada do H₂SO₄ evitando sua queima e consequente perda de massa ao serem secos em estufa a 105°C até peso constante. Após este período, estes foram removidos da estufa, resfriados em dessecador e pesados para a determinação de suas massas (M₃). O papel de filtro contendo o resíduo sólido (lignina insolúvel e cinzas) foi calcinado em mufla (modelo Q-318D24 da marca Quimis) empregando cadinhos de percelana previamante calcinados e tarados, até atingir temperatura de 800°C por duas horas. Após esse período, o cadinho contendo as cinzas foi armazenado em dessecador até atingir temperatura ambiente e em seguida pesado. O cálculo do teor de lignina insolúvel da biomassa é dado pela Equação 3.3. A massa de lignina insolúvel foi determinada pela diferença entre a massa da fração sólida contendo lignina e cinzas e a massa de cinzas obtida por calcinação.

% lignina insolúvel=
$$\left(\frac{M_3 - M_2}{M_1}\right) \times 100 - \%$$
 cinzas (3.3)

M1: massa do bagaço em g utilizando na hidrólise absolutamente seco

- M2: massa do papel filtro tarado, em g
- M3: massa do papel filtro + lignina insolúvel seca, em g

% cinzas: teor de cinzas obtido da calcinação do papel de filtro com os sólidos retidos.

3.3.3.3. Determinação de Lignina solúvel

O teor de lignina solúvel foi determinado pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível (Mini-1240 Shimadzu, Alemanha) a 280 nm. 1,0 mL de cada hidrolisado ácido mais certa quantidade de solução de NaOH 6,5N foram tranferidos para balões volumétricos de 25 mL, a solução de NaOH foi adicionada até que o pH fosse próximo de 12,5,

sendo o balão completado com água destilada. O cálculo da concentração da lignina solúvel é realizado pela equação 3.4 (GOUVEIA, *et al.* 2009).

$$C_{\text{ligninasolúvel}} = 4,187 \times 10^{-2} \left(A_T - A_{pd} \right) - 3,279 \times 10^{-4}$$
(3.4)

onde: C_{lignina solúvel} - concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T - absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; A_{pd} = $c_1\epsilon_1 + c_2\epsilon_2$ – absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c₁ e c₂ foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g-1 cm-1.

O cálculo da percentagem de lignina solúvel presente na amostra M₁ é dado pela Equação 3.5.

% lignina solúvel =
$$\left(\frac{C_{\text{lignina solúvel}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot \text{FD}}{M_1}\right) \times 100$$
 (3.5)

C_{lignina solúvel}: concentração da lignina solúvel obtido através da Equação 4.5, em g/L V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

FD: fator de diluição do hidrolisado, 25

M₁: massa do bagaço utilizada na hidrólise absolutamente seco, em g

A percentagem total de lignina presente na amostra M_1 é dada pela soma da lignina insolúvel (Equação 3.3) mais a lignina solúvel (Equação 3.5).

3.3.3.4. Determinação dos carboidratos e produtos de decomposição por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)

As concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural presentes no filtrado da hidrólise ácida do material lignocelulósico (descrito no item 3.3.3), foram analisados no cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity HPLC Agilent Technologies com detector de índice de refração IR e DAD UV-vis.

Os padrões para as soluções de arabinose, celobiose, xilose, glicose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural ficaram na faixa de concentração conforme a Tabela 6.

Os hidrolisados ácidos foram filtrados diretamente em vials utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore).

Padrões	Faixas de concentração mg/mL
Arabinose	0,05 - 4
Celobiose	0,05 - 4
Xilose	0,05 - 4
Glicose	0,05 - 4
Ácido acético	0, 1 - 2, 0
Furfural	0,005 - 0,1
Hidroximetilfurfural	0,0005 - 0,01

Tabela 6: Faixa de concentração dos padrões usados na curva de calibração.

3.3.3.4.1. Análise dos carboidratos

As amostras e os padrões foram injetados no cromatógrafo utilizando para análise a coluna Aminex HPX-87H à temperatura de 30 °C. Como fase móvel, foi usado uma solução de H₂SO₄ com pH de 2,6 preparada com água ultra-pura (Milli-Q) com fluxo de 0,6 mL/min. Os compostos separados na fase estacionária foram monitorados com um detector de índice de refração (IR) a 35 °C por um tempo de execução de 25 min. As concentrações de cada componente obtidas pelas áreas dos cromatogramas foram correlacionadas com as curvas padrão (previamente determinadas por padrões de celobiose, glicose, xilose e arabinose).

As massas de celobiose e glicose foram convertidas em celulose, com os fatores de 0,95 e 0,90, respectivamente, como também as massas de xilose e arabinose convertidas para hemiceluloses, empregando-se o fator de 0,88. O cálculo do teor de carboidratos é mostrado na equação 3.6.

$$\% a \varsigma \acute{u} cares = \left(\frac{C_{CLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado}}{M_1}\right) \times 100$$
(3.6)

CCLAE: concentração do açúcar quantificado por CLAE, em g/L.

FC: fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose= 0.95; glicose= 0.95; xilose= 0.88 e arabinose = 0.88).

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L.

M₁: massa do bagaço utilizada na hidrólise absolutamente seco, em g.

3.3.3.4.2. Análise de ácido acético

Realizaram-se as análises das amostras e padrões utilizando a coluna Biorad Aminex HPX-87H, à temperatura de 30 °C utilizando uma solução de H_2SO_4 a 0,01 mol/L filtrada e posteriormente desgaseificada como fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min. O composto separado na fase estacionária foi monitorado com um detector de índice de refração (IR) à 35 °C por um tempo de execução de 25 min.

A área do pico correspondente ao ácido acético foi utilizada para calcular a concentração do grupo acetil utilizando para isso o fator de conversão do ácido acético para acetato de 0,683. O cálculo do teor de acetato é como mostra a equação 3.7.

$$\% \ acetato = \left(\frac{C_{A \ CLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado}}{M_{1}}\right) \times 100$$
(3.7)

C_{A CLAE}: concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L
FC: fator de conversão do ácido acético em acetato, 0,683
V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L
M₁: massa do bagaço utilizada na hidrólise absolutamente seco, em g

3.3.3.4.3. Análise de furfural e hidroximetilfurfural

Para quantificação de furfural e hidroximetilfurfural, utilizou-se uma coluna Nova-Pak C18 (Waters Co., Milford, MA) a temperatura de 30° C, a fase móvel foi uma solução de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético), previamente filtrada e degaseificada, com fluxo

de 0,8 mL/min. Os compostos separados foram monitorados pelo detector UV-VIS no comprimento de onda de 280 nm e tempo de execução de 20 min.

Empregaram-se as áreas dos picos correspondentes ao furfural e hidroximetilfurfural no cálculo, para descobrir a concentração na amostra, para isso usou-se um fator de conversão de 1,37 e 1,2, respectivamente. O cálculo do teor de furfural é dado pela a equação 3.8.

$$\% \ furfural = \left(\frac{C_{FCLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado}}{M_1}\right) \times 100$$
(3.8)

C_{F CLAE}: concentração de furfural quantificado por CLAE, em g/L.

FC: fator de conversão do furfural, 1,37.

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L.

M₁: massa do bagaço utilizada na hidrólise absolutamente seco, em g.

O cálculo do teor de hidrometilfurfural é dado pela a equação 3.9.

% hidroximetilfurfural =
$$\left(\frac{C_{H CLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado}}{M_{1}}\right) \times 100$$
 (3.9)

C_{H CLAE}: concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L.

FC: fator de conversão do hidroximetilfurfural, 1,20.

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L.

M₁: massa do bagaço utilizada na hidrólise absolutamente seco, em g.

3.4. Determinação da concentração de proteína

A quantificação de proteínas foi realizada primeiramente para as enzimas celulase de *Trichoderma reesei* Celluclast 1.5 L da Novozyme e β-glicosidase de *Aspergillus niger* Novozyme 188 da Sigma-Aldrich e posteriormente nos experimentos de adsorção e isoterma. Para determinação da concentração de proteína fez-se o uso do método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca

o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm. O cálculo para a dosagem de proteínas foi realizado a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina da Sigma-Aldrich na faixa de 0,01-0,2 mg/mL.

A quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford foi realizada com 1 mL do reagente de Bradford mais 0,1 mL da amostra que permaneceram incubados por 5 minutos, após o período de incubação, realizou-se a leitura das amostras em cubetas para espectrofotômetro de 1,5 mL no espectrofotômetro 600S (Femto, Brasil) a 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.1. Determinação da concentração de proteína nas enzimas celulase e β-glicosidase

A dosagem de proteinas para as enzimas foi realiza com o intuito de se saber o teor proteico para cada enzima (celulase e β -glicosidase) que será correlacionado com a quantidade de proteína utilizada em cada ensaio de cinética e isoterma de adsorção das enzimas do complexo celulolítico. A curva de calibração é apresentada na Figura 11. Pode-se observar que a correlação entre absorbância a 595nm e concentração de albumina bovina se mostrou linear para concentrações de albumina variando entre 0,01 e 0,2 mg/mL.



Figura 11: Curva elaborada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. O gráfico correlaciona a concentração de proteínas com a absorbância a 595 nm.
A Tabela 7 mostra os teores das proteínas para cada mL de enzima. A equação da reta obtida pelo gráfico, presente na Figura 11, foi utilizada no cálculo para a quantificação de proteínas. A absorbância à 595nm obtida para cada solução enzimática previamente diluída foi substituída na equação (Tabela 7). A diluição usada foi 1:1000 para ambas soluções enzimáticas, e o fator da diluição foi utilizado para multiplicar o resultado final obtido pela equação.

Engineer	ABS		Proteína	Fator	Proteína
Enzimas	(média)	Calculo Equação	(mg/mL)	diluição	(mg/mL)
Celulase	0,180±0,44	$y = 0,3108 \times 0,180 - 0,0065$	0,04944±0,44	1000	49,44±0,44
β- glicosidase	0,183±0,43	<i>y</i> = 0,3108 × 0,180 – 0,0065	0,05037±0,43	1000	50,37±0,43

Tabela 7: Teor de proteína das enzimas do complexo celulolítico.

3.5. Métodos analíticos para a quantificação de Açúcares

Os métodos para a quantificação de açúcares descritos nos itens 3.5.1 e 3.5.2 foram realizados somente para se determinar as atividades enzimáticas da celulase e da β -glicosidade.

3.5.1. Quantificação de Glicose

Para a quantificação da glicose, utilizou-se a metodologia descrita por Rabelo (2010), onde, adicionou-se 20 µL de cada uma das amostras (diluições de uma solução de glicose na faixa de 0 a 5 g/L) em tubos de ensaio previamente identificados com 2,0 mL do mono-reagente do kit enzimático GOD-PAP. Os tubos foram mantidos em um banho termostático a 37°C por 10 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada. Ao término da reação foi adicionado aos tubos, 3 mL de água destilada e em seguida, efetuada a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, foi utilizado um tubo denominado "branco" com apenas o reagente. Quando necessário, diluições das amostras foram efetuadas para possibilitar a leitura, já que a reação, segundo o fabricante, é linear até 500 mg/dL.

3.5.2. Quantificação de açúcares redutores totais (ART)

As concentrações de ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitrosalicilico (DNS) segundo MILLER (1959). Adiciona-se 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8, com 0,5 mL de amostras (diluições de glicose para elaboração da curva de calibração) em cada tubo de ensaio, em seguida, 0,5 mL de reagente DNS também foi adicionado. Os tubos foram mantidos em um banho a 95 °C durante 5 min. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente em um banho de gelo fundente, adicionando-se em seguida 3,5 mL de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. As leituras da absorbância foram efetuadas no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um "branco", onde o volume da amostra foi substituído por tampão citrato de sódio. Para o cálculo de concentração de glicose foi feita uma curva de calibração partindo de uma solução de 5 g de glicose/L onde foram realizadas as diluições necessárias para que absorbância das amostras estivesse dentro do intervalo da curva padrão.

3.6. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade das enzimas partiu-se da metodologia descrita por Rabelo (2010), onde se realizou várias diluições das enzimas em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8. As enzimas utilizadas foram: a celulase de *Trichoderma reesei* Celluclast 1.5 L Novozyme e β -glicosidase de *Aspergillus niger* Novozyme 188 da Sigma-Aldrich. Para a celulase, determinou-se a atividade como atividade de filtro de papel (FPA) e expressa em unidades de filtro de papel (FPU – Filter Paper Units) por volume de enzima original, de acordo com IUPAC (GHOSE, 1987; WOOD e BHAT, 1988; ADNEY e BAKER, 1996). Para a β -glicosidase, a medida da atividade foi determinada através de uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU) por volume de enzima original, de acordo com IUPAC (WOOD e BHAT, 1988).

3.6.1. Determinação da atividade da celulase

Para a determinação da atividade da celulase seguiu-se a metodologia descrita por Rabelo (2010). Partiu-se de uma solução de celulase (Celluclast 1.5 L) de diluição de 1:20 e 5 novas diluições foram realizadas a partir desta. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 50 mg de papel de filtro e em seguida 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50 °C durante 10 minutos para equilíbrio de temperatura. Em seguida, sem retirar do banho, adicionou-se 0,5 mL da enzima diluída a cada tubo e estes reagiram por 60 minutos. Ao final deste período, interrompeu-se a reação em um banho de gelo fundente e após, adicionou-se 1,5 mL de DNS. Os tubos foram fervidos durante 5 minutos a 95 °C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Em seguida, adicionou-se 10,5 mL da solução estabilizante e homogeneizou-se a solução invertendo os tubos. Após o assentamento da polpa de papel restante da reação de hidrólise, a amostra foi lida no espectrofotômetro a 540 nm.

Para o preparo do tubo do branco, adicionou-se 1,5 mL do tampão citrato e findado os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNS. Os tubos controle da enzima foram preparados adicionando-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das diluições da enzima, totalizando 5 tubos controle, que ao final do tempo reacional, tiveram suas reações paradas com a adição do DNS, e então reagidos como descrito anteriormente. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de filtro de papel enrolado, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNS.

Para o cálculo da atividade enzimática, segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de 2,0 mg de glicose equivalente em mols (2,0/0,18016 µmol) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5 mL), e no tempo de incubação requerido (60 minutos) para a geração dos equivalentes (enzima diluída). Este conceito é mostrado na Equação 3.10.

$$FPU/mL = \frac{2.0}{(0.18016 \times 0.5 \times 60 \times [enzimadiluida])} \mu mol. \min^{-1} .mL^{-1}$$
(3.10)

$$FPU/mL = \frac{0,37}{[enzimadiluída]}$$

3.6.2. Determinação da atividade da β-glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi determinada através de uma solução de celobiose (marca novozymes) 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU), a metodologia seguida segundo WOOD e BHAT, (1988), foi descrita por Rabelo (2010).

Para a determinação da atividade enzimática da β -glicosidase, partiu-se de uma solução de diluição de 1:1000 e 5 novas diluições foram realizadas a partir desta, em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8. Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e estes foram colocados em um banho termostático a 50°C para que a temperatura se equilibrasse. Após 10 minutos, foi adicionado em cada tubo, 1,0 mL da solução de celobiose 15 mmol/L e os tubos foram encubados por 30 minutos. Ao término da reação, os tubos foram imersos em um banho de água fervente por exatamente 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo.

Para a determinação da concentração de glicose liberada de cada solução de enzima diluída, utilizou-se o método de quantificação Glicose GOD-PAP (item 3.6). Foram preparados também, 4 tubos controle da enzima, onde se adicionou 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e 1,0 mL do tampão citrato. Ao final do tempo reacional, aplicou-se o método enzimático Glicose GOD-PAP. Ao tubo controle do substrato adicionou 1,0 mL do substrato celobiose e 1,0 mL do tampão citrato que ao final de 30 minutos de reação também foi analisado pelo método enzimático Glicose GOD-PAP.

Para o cálculo da atividade enzimática, leva-se em consideração que uma unidade da atividade de β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. A Equação 3.11 mostra o cálculo da atividade.

$$CBU/mL = \frac{0.5}{(0.1816 \times 1.0 \times 30 \times [enzimadiluida])} \mu mol. \min^{-1} .mL^{-1}$$

$$CBU/mL = \frac{0.0926}{[enzimadiluida]}$$
(3.11)

3.6.3. Determinação da atividade enzimática

A determinação das atividades enzimáticas, tanto da enzima celulase quanto da β glicosidase foram feitas para dosar os volumes corretos de enzimas, necessários para realização das hidrólises enzimáticas. As Figuras 12 e 13 apresentam os comportamentos dos dados obtidos na determinação das atividades da celulase e β -glicosidase, respectivamente.



Figura 12: Comportamento da enzima celulase. Logaritmo da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída.

Com a Equação 3.10 mostrada no item 3.6.1, juntamente com a equação da reta obtida através do gráfico da Figura 12, foi possível calcular a atividade da enzima celulase.

$$\log[enzima] = -2,375$$

$$[enzima] = 4,217 \times 10^{-3}$$

$$FPU/mL = \frac{0.37}{[enzimadilui(da]]} = \frac{0.37}{4.217 \times 10^{-3}} = 87.74 FPU/mL$$

Assim, o valor obtido para a atividade em FPU/mL da enzima celulase foi de 87,74. Esse valor foi utilizado para encontrar o volume de enzima necessário para cada hidrólise enzimática realizada.

A Figura 13 mostra o comportamento da enzima β -glicosidase.



Figura 13: Gráfico da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL da enzima β -glicosidase diluída.

Para o cálculo da concentração de enzima, utilizou-se a Equação 3.11 (mostrada na seção 3.6.2) e a equação da reta obtida pelo gráfico na Figura 13.

$$[enzima] = 0,0002 \times 1 - 0,00005$$
$$[enzima] = 0,00015$$
$$CBU/mL = \frac{0,0926}{[enzima]} = \frac{0,0926}{0,00015} = 617,33CBU/mL$$

O valor encontrado para a atividade da β -glicosidase, de 617,33 CBU/mL foi utilizado também para a obtenção do volume necessário de enzima empregado para cada hidrólise enzimática realizada.

3.7. Hidrólise do Bagaço Pré-Tratado

As hidrólises foram realizadas para os bagaços pré-tratados hidrotérmico e organossolve em duplicata, nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima, com a finalidade de quantificar os açúcares liberados durante esta etapa.

Após a secagem dos bagaços resultantes dos pré-tratamentos, a hidrólise enzimática foi realizada para cada um dos materiais, utilizando uma concentração de 5% (m/v) de sólidos. O pH das amostras foi ajustado para 4,8 (pH ótimo) e os erlenmeyers foram fechados e incubados em um shaker à 150 rpm. A temperatura utilizada durante a hidrólise foi de 50°C, mesmas condições usadas no trabalho de Rabelo (2010).

Para avaliar a liberação em glicose, alíquotas do líquido reacional de hidrólise (aproximadamente 2 mL) foram coletadas em períodos de tempo pré-determinado (6, 12, 24, 36, 48, e 72 h), e em seguida, fervidas por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas. Ao final das 72 h de hidrólise, os resíduos da hidrólise foram transferidos para uma peneira de 150 mesh e lavados em água corrente para remoção do açúcar residual (aproximadamente 200 mL água). As amostras foram secas a 105°C, pesadas e armazenadas.

3.7.1. Quantificação dos Carboidratos no Hidrolisado

Os carboidratos liberados após a hidrólise enzimática foram quantificados por CLAE, como descrito nos ítens 3.3.3.4.1, 3.3.3.4.2 e 3.3.3.4.3. Para a quantificação dos açúcares do hidrolisado, uma curva de calibração foi construída. Os padrões para as soluções de arabinose, celobiose, xilose, glicose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural ficaram na faixa de concentração conforme a Tabela 8.

Padrões	Faixas de concentração mg/mL
Arabinose	0,03 – 10,05
Celobiose	0,03 - 10,5
Xilose	0,05 - 15,47
Glicose	0,05 - 15,14
Ácido acético	0, 1 - 2, 0
Furfural	0,005 - 0,1
Hidroximetilfurfural	0,0005 - 0,01

Tabela 8: Faixa de concentração dos padrões usados na curva de calibração.

Após a quantificação dos açúcares, foi traçado o perfil da hidrólise para cada ensaio, relacionando a concentração dos açúcares liberados no meio reacional em funçãodo tempo de hidrólise.

3.8. Cinética e isoterma de adsorção da celulase na biomassa

A cinética de adsorção da celulase nos materiais pré-tratados e na celulose pura foi realizada variando a carga de sólidos (5% e 10%) das biomassas e adicionando uma carga fixa de enzima de 4 mg de proteína/g de substrato (5,5 FPU/g biomassa). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e para cada ponto analisado foi utilizado um frasco. Para uma melhor visualização, os experimentos e as condições experimentais estão listadas na Tabela 9.

Cinética de adsorção				Isotema de adsorção			
Proteína (mg de proteína/g de substrato)	Tempo de amostragem (h)	Agitação (rpm)	Quantidade de substrato (%, m/v)	Proteína (mg de proteína/g de substrato)	Tempo de amostragem (h)	Agitação (rpm)	
		40,	Avicel (5)	0,1-4,5	0,5		
4	0; 0,16; 0.5: 1: 2:	100, 150.	B. Hidrotérmico (5)	{0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1 0: 1 25:	3	150	
	3; 4 e 6	200 e 250	B. Organossolve (5)	1,0; 1,22; 1,5; 2,0; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5, 4,0; 4,5}	3		
	Cinética de Proteína (mg de proteína/g de substrato)	Cinética de adsorçãoProteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)0; 0,16;0; 0,16;40,5; 1; 2;3; 4 e 6	Cinética de adsorçãoProteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)Agitação (rpm) $Agitação(rpm)(rpm)40,40,0; 0,16;100,40,5; 1; 2;150,3; 4 e 6200 e250$	Cinética de adsorçãoProteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)Agitação (rpm)Quantidade de substrato ($\%, m/v$)Agitação (rpm)Quantidade de substrato ($\%, m/v$)Avicel (5)40; 0, 16; 0; 0, 16;100, 100,B. Hidrotérmico (5)40,5; 1; 2; 3; 4 e 6150, 200 eB. Organossolve (5)	Cinética de adsorçãoIsotema deProteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)Agitação (rpm)Quantidade de substrato ($\%$, m/v)Proteína (mg de proteína/g de substrato)40; 0, 16; 0, 16; 0, 5; 1; 2;100, 100,Avicel (5)0,1-4,540; 0, 16; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 6100, 200 eB. (5) $\{0,1; 0,2;$ 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5; 2,75; 3,0; 3,5, 4,0; 4,5}	Cinética de adsorçãoProteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)Agitação (rpm)Quantidade de substrato ($\%$, m/v)Proteína (mg de proteína/g de substrato)Tempo de amostragem (h)40; 0, 16; 0; 0, 16;100, 100,Avicel (5)0,1-4,50,540; 0, 16; 0,5; 1; 2;150, 200 eB. (5){0,1; 0,2;} 0,5; 0,75; 1,0; 1,25;333; 4 e 6200 eB. 2502,5; 2,75; (5)34,0; 4,5}2500rganossolve (5)3,0; 3,5, 4,0; 4,5}3	

Tabela 9: Arranjo experimental para as cinéticas e isotermas de adsorção das enzimas.

Observações: Foram feitos ensaios nas temperaturas de 4 e 50°C e o pH do meio reacional foi de 4,8, para todos os ensaios.

Os ensaios de cinética de adsorção foram primeiramente realizados para 5% de sólidos, em Erlenmeyer de 125 mL com volume reacional de 15 mL, onde se adicionou: biomassa seca, tampão de citrato de sódio pH 4.8 50mM complementado com 0.02% de azida sódica por grama de biomassa. Em seguida, os frascos foram para a incubadora refrigerada MA 832 (Marconi, Brasil) a 50°C e 4°C, permanecendo por 60 minutos para que a temperatura se equilibrasse, e posteriormente, a enzima foi adiconada em cada frasco. Cinco agitações foram testadas, (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm), a agitação foi modificada para verificação do processo de transferência de massa na cinética de adsorção. Nos ensaios realizados a 50°C adicionou-se ao meio reacional uma solução de glicose com concentração 250 vezes maior que a concentração protéica da enzima usada nos ensaios para que a enzima celulase fosse inibida, de forma que o fenômeno de adsorção ocorresse sem a presença de reação, conforme demonstrado no trabalho de Maurer et al. (2012). Durante o experimento, amostras do sobrenadante foram recolhidas, centrifugadas em centrífuga NT 810 (Novatecnica, Brasil) e filtradas. Para a filtragem, utilizaram-se filtros MILLEX - HV com membrana de PVDF, 0,45 µm de poro, 13mm de diâmetro (Milipore). As amostras, então, foram analisadas para a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford descrito no item 3.4. Posteriormente, ensaios com a maior

concentração de sólidos (10%) foram realizados para as biomassas, seguindo todos os passos já descritos. A velocidade da agitação também variou (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm).

Para determinar a isoterma de adsorção, trabalhou-se com 5% de sólidos, e, para isso, usou-se Erlenmeyer de 125 mL com volume reacional de 15 mL, onde se adicionaram: biomassa seca e tampão citrato de sódio pH 4,8 50mM complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa. Em seguida, os frascos foram para a incubadora refrigerada a 50°C ou 4°C onde permaneceram por 60 minutos, para que a temperatura se equilibrasse; após o período, foi adicionado em cada Erlenmeyer diferentes concentrações de proteína, as quais variaram entre 0,1-4,5 mg/mL (m/v) que correspondem a uma atividade na faixa de 4,19 – 188,7 FPU/g de bagaço. A agitação e a temperatura foram constantes (150 rpm e 50°C ou 4°C). Foi recolhida uma amostra de cada Erlenmeyer para a quantificação de proteína livre no sobrenadante, no tempo estimado pelas cinéticas, onde se atingiu o equilíbrio da adsorção. A quantidade de proteína adsorvida ao substrato foi calculada pela diferença entre proteína livre na solução e proteína total adicionada inicialmente ao meio da reação. Os dados experimentais foram ajustados para a isoterma de Langmuir:

$$E_{ad} = \frac{E_{\max}K_p E_f}{1 + K_p E_f} \tag{3.12}$$

Onde, E_{ad} é a enzima adsorvida (mg ou µmol de enzima/g de substrato); E_{max} é a adsorção máxima de enzima por g de substrato (mg ou µmol enzima/g substrato); E_f é a concentração de enzima livre (mg ou µmol enzima/mL); K_p é a constante de equilibrio da adsorção (mL/mg ou µmol de enzima) (ZHENG, 2007).

3.9. Cinética de adsorção da β-glicosidase na biomassa

Os experimentos da cinética de adsorção da β -glicosidase nos bagaços pré-tratados e em Avicel seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.8, exceto pela carga fixa de enzima utilizada, que foi de 2 mg de proteína/g de substrato (22,13 CBU/g biomassa) para a obtenção da cinética de adsorção.

3.10. Preparação da lignina

Para a obtenção da lignina, o bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico foi hidrolizado por 96 h nas dosagens enzimáticas de 15 FPU e 25 CBU/g de biomassa seca. Primeiramente, a hidrólise enzimática se deu com amostras de 9 g de bagaço seco imersas em 300 mL de tampão citrato pH 4,8 50mM complementado com 0,02% azida sódica por grama de biomassa, correspondendo a uma carga de sólidos de 3% (m/v). O ensaio foi feito em duplicata. Em seguida, estas amostras seguiram para a incubadora, com rotação de 150 rpm e temperatura controlada de 50°C, as enzimas só foram adicionados uma hora após, quando a temperatura estivesse equilibrada. O volume reacional foi de 300 mL em um frasco erlenmeyer de 1L.

Terminado o tempo reacional de 96 h da hidrólise enzimática do material hidrotérmico, o resíduo foi separado do líquído e lavado com água. No intuito de se dessorver toda enzima que estivesse ainda adsorvida a esse resíduo, seguiu-se uma metodologia modificada, proposta por Tu *et al.* (2009), Pribowo *et al.* (2012) e Kumar *et al.* (2012), onde aos resíduos, após a lavagem com água, foram adicionados 300 mL de tampão acetato 50mM pH 5,3 com 0,5% de tween 80 (v/v), seguindo para incubadora por 2h a 44°C. Após esse período, as suspenções foram sonicadas a 40KHz por 60 minutos no aparelho UltraSonic clear USC-2800 (Unique, Brasil). Em seguida, os materiais foram lavados por mais 3 vezes com água destilada corrente e secos em temperatura ambiente.

3.11. Cinética e isoterma de adsorção da celulase na lignina

A cinética e a isoterma de adsorção da celulase na lignina realizaram-se como descrito na seção 3.8. Entretanto somente a lignina obtida pelo processo da seção 3.10 foi utilizada como biomassa.

3.12. Análise estatística

Quando necessário, foi realizada uma análise estatística dos valores obtidos pelos experimentos. Para comparação entre as respostas dos ensaios foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey, através do programa Statistica (data analysis software system), versão7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise da composição química dos bagaços

A análise da composição química dos bagaços de cana-de-açúcar in natura e pré-tratados, junto com os devios padrão, encontram-se na Tabela 10. Os ensaios foram realizados em duplicata para as tês biomassas. Somente para o bagaço in natura que se realizou a etapa de extrativos, uma vez que, durante os pré-tratamentos, os compostos que são retirados na etapa de extração são removidos na reação de pré-tratamento, tornando desnecessária a etapa de extrativos para os bagaços pré-tratados.

	(*)	Dagaga Drá Tratada	(*)	
Componente	Bagaço in natura	Hidrotármico (%)	Bagaço Pré-Tratado	
	(%)	maroternico (%)	Organossolve (%)	
Celulose	$40,75 \pm 0,04$	$61,07 \pm 0,97$	$86,91 \pm 0,40$	
Hemiceluloses	$28,42 \pm 0,64$	$2,1 \pm 0,06$	$6,63 \pm 0,25$	
Lignina Total (Solúvel	21.64 ± 0.11	21.07 ± 0.047 4.42 ± 0.047	4.42 ± 0.27	
e Insolúvel)	$21,04 \pm 0,11$	51,97 ± 0,047	4,42 ± 0,27	
Cinza	$5,34 \pm 0,42$	$6,44 \pm 0,056$	$3,75 \pm 0,11$	
Extrativos	$5,29 \pm 0,04$	-	-	
Total	$101,43 \pm 0,11$	$101,58 \pm 1,05$	$101,31 \pm 0,49$	

Tabela 10: Composição química dos bagaços in natura e pré-tratados pelo método hidrotérmico e organossolve.

(*) Composição química fornecida pela Dra. Sarita Cândida Rabelo, no CNPEM | CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol.

Observando a Tabela 10, nota-se que para as três biomassas, os componentes que estão em maior porcentagem são a celulose e lignina. Para o bagaço in natura, é visto que os componentes: celulose, hemiceluloses e lignina estão em maior quantidade, seguidos da cinza e extrativo. Para os bagaços pré-tratados, observa-se que houve quase que total solubilização das hemiceluloses. O pré-tratamento hidrotérmico é caracterizado pela remoção de mais de 80% de hemicelulose, que melhora a digestibilidade da biomassa na etapa de hidrólise enzimática, porém a solubilização de lignina é pouca ou nenhuma. Quando observamos os valores obtidos da composição química do material organossolve, na Tabela 10, a solubilização da lignina é evidente, o que aumenta a concentração de celulose no material, alcançando mais de 80%. Os valores obtidos para a composição química dos materiais estão, de um modo geral, dentro da faixa dos valores encontrados na literatura (CASTRO & PEREIRA Jr. 2010; CHRISTOFOLETTI, 2010; RABELO et al., 2011), já que a constituição final de cada planta sofre a influência de vários fatores, como por exemplo, constituição do solo, temperatura, umidade, método de plantio, época de colheita entre outros, fazendo com que plantas de mesma espécie apresentem composições diferentes (RABELO, 2010).

Para uma melhor visualização dos componentes que foram solubilizados, a Tabela 11 apresenta o balanço de massa para as biomassas secas. Para isso, é bom destacar que para o pré-tratamento hidrotérmico obteve-se 57,84 % \pm 2,59 de rendimento (razão massa inicial/massa final de bagaço após pré-tratamento), e para o pré-tratamento organossolve o rendimento obtido foi de 47,19% \pm 1,85 (razão massa inicial/massa final de bagaço após pré-tratamento).

Composição Química	Bagaço in natuta (100 g)	Bagaço Pré- Tratado Hidrotérmico (57,84 g)	Porcentagem solubilizada (%)	Bagaço Pré- Tratado Organossolve (47,19 g)	Porcentagem solubilizada (%)
Celulose	40,75 ± 0,04	$35,32 \pm 0,3$	13,32	$41,01 \pm 0,19$	-
Hemiceluloses	28,42 ± 0,64	$1,21 \pm 0,034$	95,74	$2,93 \pm 0,12$	88,98
Lignina Total (Solúvel e Insolúvel)	21,64 ± 0,11	$18,5 \pm 0,03$	14,51	$2,08 \pm 0,12$	90,38
Extrativos	5,29 ± 0,04	-	-	-	-

Tabela 11: Composição para o bagaço de cana seco antes e após os pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve, corrigido pelos rendimentos dos pré-tratamentos.

As fotos apresentadas na Figura 14 ilustram o aspecto visual do bagaço in natura e após as diferentes condições de pré-tratamento a que foi submetido. É possível observar que o bagaço ficou mais escuro com o pré-tratamento hidrotérmico, e quando submetido ao pré-tratamento organossolve, o bagaço apresentou uma coloração mais clara. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante o pré-tratamento hidrotérmico, pouca ou nenhuma lignina é solubilizada, enquanto que no pré-tratamento organossolve, praticamente toda lignina é removida. As texturas também diferem (o bagaço organossolve apresenta visual mais poroso que o hidrotérmico), uma vez que estão relacionadas com as mudanças na estrutura química do bagaço. Essas mudanças podem ser mais bem observadas pelas fotos da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), apresentadas na Figura 15.



Figura 14: Foto do bagaço in natura (a); e pré-tratado pelos métodos: Hidrotérmico, 190°C/10 minutos (b), Organossolve 190°C/150 minutos (c).

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, o qual se encontra na Faculdade de Engenharia Química - FEQ/Unicamp. As imagens foram adquiridas com um equipamento eletrônico de varredura com detector de energia dispersiva de raios X, de marca MEV/EDS: LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra), operado com tensão de aceleração igual a 5 kV e corrente do feixe igual a 50 pA. As amostras foram preparadas com partículas metálicas de ouro, que agiram como um recobrimento metálico. Para isso foi utilizado o equipamento: Sputter Coater POLARON, Modelo: SC7620, Marca: VG Microtech (Uckfield, Inglaterra).

(c)





(g)

(h)

(i)



Figura 15: Imagens da MEV nas ampliações de 50X, 250 X e 1000X, respectivamente para (a, b e c) bagaço in natura, (d, e, f) bagaço pré-tratado hidrotérmico e (g, h e i) bagaço pré-tratado organossolve.

O bagaço pré-tratado organossolve, abreviado por BO, apresentou aspecto poroso, que pode estar relacionado com a abertura das fibras e remoção da lignina. Pelas micrografias (Figura 15), fica evidente que o pré-tratamento organossolve promove maior rompimento dos feixes, tornando as fibras celulósicas mais expostas e disponíveis para o ataque enzimático em uma hidrólise. Portanto, as fotomicrografias corroboram as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas em cada pré-tratamento da biomassa, e aumentando sua área superficial.

4.2. Preparação do isolado de lignina

Na preparação do isolado de lignina, partiu-se somente do material pré-tratado hidrotérmico (BH), pelo fato do material proveniente do pré- tratamento organossolve apresentar pouco teor de lignina (4,42%), como mostrado na Tabela 10, o que dificultaria a obtenção do isolado do mesmo.

Para quantificação desse material, foram considerados os valores da caracterização química do bagaço pré-tratado hidrotérmico (Tabela 10) e a porcentagem de material sólido obtido após 96 horas de hidrólise enzimática nas condições descritas na seção 3.10.

	Massa de bagaço	Domontogon de ligning (%)		
	(g em base seca)	r orcentagem de lighina (%)		
Massa inicial	$9,615 \pm 0,001$	$31,97 \pm 0,047$		
Massa após hidrólise de 96 hr	$3,93 \pm 0,11$	$78,12 \pm 0,024$		

Tabela 12: Balanço de massa da hidrólise enzimática para obtenção do isolado de lignina.

De acordo com a massa de material antes e pós hidrólise apresentada na Tabela 12 e com a porcentagem de lignina incial do bagaço tem-se que 3,07 g do material inicial é lignina, o que corresponde a 78,12% do material residual, onde foi considerado que a massa de lignina permanece constante durante a hidrólise, enquanto que os demais 21,88% são considerados como outros materiais constituintes da massa residual da hidrólise. Considerou-se também para esse material que houve a dessorção das enzimas adsorvidas durante as 96 horas de sacarificação, uma vez que a metodologia modificada para a dessorção de enzimas dos materiais lignocelulósicos foi seguida rigorosamente, como descrito no item 3.10, onde Tu *et al.* (2009), em seu estudo, estima que aproximadamente 90% das celulases são dessorvidas do resíduo da hidrólise. Além disso, nos trabalhos de Borjesson *et al.* (2007), Park *et al.* (1992) e Eriksson *et al.* (2002), que fizeram o uso de surfactantes para diminuir a adsorção de celulases à lignina, eles afirmam que a adição de surfactantes como o PEG e o Tween 20 podem eliminar em alto grau a desativação enzimática à lignina, devido a exclusão das enzimas da superfície da lignina. De acordo com Park *et al.* (1992), as diferentes séries do surfactante Tween atuam também na dessorção das enzimas celulases de substratos insolúveis durante a sacarificação, o que aumenta o rendimento desta. Em resumo, a adição de surfactantes é significativamente eficaz e reduz a adsorção não específica das enzimas do complexo celulolítico sob a lignina.

4.3. Estudo da cinética de adsorção das enzimas celulase e β-glicosidase nos frascos de vidro Erlenmeyer

Os experimentos das cinéticas de adsorção das enzimas do complexo celulolítico nos frascos de vidro Erlenmeyer foram conduzidos conforme descritos nos itens 3.8 e 3.9 para a celulase e para a β -glicosidase, respectivamente. Esses experimentos foram desenvolvidos, pois a pesquisa de Bommarius *et al.* (2008) mostrou que as enzimas celulase e β -glicosidase possuem alta afinidade por diversos materiais e consequentemente adsorvem não especificamente nas superfícies, principalmente em frascos Eppendorf com paredes de polipropileno, onde a adsorção da enzima celulase foi tão grande que não foi possível determinar a adsorção das enzimas no substrato Avicel.

Assim, ensaios de referência para esse trabalho foram realizados com a adição da quantidade de enzima correspondente a 4 mg/g substrato da enzima celulase e 2 mg/g substrato da enzima β -glicosidase nas diferentes concentrações de substrato consideradas (5 e 10%), mas sem a adição de sustrato. As amostras permaneceram incubadas por 6 horas à 50°C e 150 rpm de agitação, com o intuito de reproduzir e comparar os ensaios na presença de substrato.

As Figuras 16 e 17 mostram os gráficos obtidos da cinética de adsorção na parede dos frascos de vidro com a adição das enzimas celulase e β-glicosidase ao meio reacional. Pode-se

abservar em ambos os gráficos (Figuras 16 e 17) a quantidade em proteína das enzimas livres no sobrenadante. Verifica-se que houve adsorção das enzimas nas paredes dos frascos, e que essa adsorção ocorreu aproximadamente nos primeiros 10 minutos da reação. Após esses 10 minutos, observa-se que nenhuma proteína é adsorvida e a concentração de proteína no sobrenadante se manteve constante durante as 4 horas restantes.

Mesmo com a diferença entre a concentração inicial de proteína adicionada ao meio reacional e com as diferenças conformacionais entre as duas enzimas (celulase e β -glicosidase), fica claro pelos gráficos, Figuras 16 e 17, que a quantidade adsorvida das enzimas na parede dos frascos de vidro foi a mesma nos dois casos. Para a Figura 16 onde se tem o perfil de proteínas livres no sobrenadante para a enzima celulase, foi visto uma redução de aproximadamente 25% da concentração inicial das enzimas no meio reacional líquido, decorrente da adsorção dessas à parede do frasco de vidro, durante o período da reação. Quando a concentração protéica inicial é dobrada de 0,2 mg/mL de solução para 0,4 mg/mL de solução é observado o mesmo comportamento. Na Figura 17, onde a β -glicosidase também é adicionada em duas concentrações diferentes (0,1 mg/mL de solução e 0,2 mg/mL de solução), foi observado que também houve uma redução proteica de 25% das enzimas presentes no sobrenadante.

Em estudos de adsorção das enzimas celulase e β -glicosidase na parede de frascos de vidro sem a presença de substrato, Bommarius *et al.* (2008) observaram que 24% das celulases foram adsorvidas na parede do frasco, concordando com os resultados apresentados nesse trabalho (25%), entretanto para a β -glicosidase, a adsorção na parede dos frascos encontrada pelos pesquisadores foi de 42%, diferente dos resultados aqui mostrados (25%). Esses resultados apresentados confirmaram a perda de enzimas na parede dos frascos de vidro por adsorção inespecífica e foram significativos nesses experimentos onde não houve a adição de substrato sólido ao meio reacional. A diferença encontrada para a adsorção da β -glicosidase deve ser pelo uso de uma preparação enzimática comercial distinta.



Figura 16: Quantidade de celulase livre com o tempo reacional. Condições de reação: temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm, concentrações iniciais de celulase de 0,2 e 0,4 mg/mL (correspondentes a 4mg/g substrato) referentes a cargas de sólidos de 5% e 10 % (m/v) respectivamente.



Figura 17: Quantidade de β -glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm, concentrações iniciais de β -glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2mg/g substrato) referentes a cargas de sólidos de 5% e 10% (m/v) respectivamente.

4.4. Estudo da cinética de adsorção da enzima β-glicosidase no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método hidrotérmico e na celulose pura (Avicel) a 50°C

Os ensaios realizados para o estudo da cinética de adsorção da enzima β -glicosidade nos substratos Avicel e BH foram conduzidos seguindo o item 3.9 na temperatura de 50 °C e agitação de 150 rpm. Realizaram-se esses experimentos porque os dados encontrados na literatura para a adsorção da enzima β -glicosidase são bastante contraditórios para os diferentes substratos celulósicos. Alguns estudos reportam uma adsorção significativa da β -glicosidase nos materias lignocelulósicos e em celulose pura (YANG & WYMAN 2006; OOSHIMA *et al.*, 1986), enquanto outros mostram pouca ou nenhuma adsorção da β -glicosidase nesses substratos (LU *et al.*, 2002; BERLIN *et al.*, 2006). Acredita-se que tal discrepância entre os trabalhos está nas diferenças entre as enzimas utilizadas nos experimentos de adsorção, tal como, a diferença nos substratos e no pré-tratamento a que foram submetidos.

Neste trabalho, pode-se observar através da Figura 18, a quantidade proteica da β glicosidase no sobrenadante da reação de adsorção, na presença da celulose pura (Avicel). Pelo gráfico (Figura 18), pode-se dizer que houve pouca redução da concentração de proteína no sobrenadante. Mesmo dobrando a concentração de sólidos na reação de 5% para 10% (m/v), a redução de proteínas fica bem próxima daquela observada na Figura 17 do item 4.6, onde se tem a redução da concentração proteica da enzima β -glicosidase pela perda da enzima que adsorveu na parede do vidro. O mesmo perfil foi obtido para a maior concentração de sólidos (10%) m/v.

Para a Figura 19, têm-se o gráfico da concentração proteica da enzima β -glicosidase na fase líquida do meio reacional contendo o substrato lignocelulósico BH, em função do tempo. Observa-se que não houve redução da concentração da enzima no sobrenadante da reação de adsorção, indicando que a enzima β -glicosidase não adsorveu no substrato mesmo quando a concentração do mesmo foi aumentada de 5% para 10% (m/v). Pela Figura 19, também se pode dizer que não teve adsorção da enzima pela parede do frasco, devido ao bagaço ser mais volumoso e ocupar o frasco reacional em maior extensão que a Avicel, o que previniu a perda da enzima pela adsorção dessa na parede do frasco.



Figura 18: Quantidade de β -glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: 50°C, agitação de 150 rpm sob as concentrações iniciais de β -glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2 mg/g de Avicel) referentes a 5% e 10% de sólidos (m/v), respectivamente.



Figura 19: Quantidade de β -glicosidase livre com o tempo reacional. Condições de reação: 50°C, agitação de 150 rpm sob concentrações iniciais de β -glicosidase de 0,1 e 0,2 mg/mL (correspondentes a 2 mg/g de bagaço) referentes a 5% e 10% de sólidos (m/v) respectivamente.

Em estudos de adsorção da enzima β -glicosidade na celulose pura (Avicel), Zhu *et al.* (2009) mostraram que durante os ensaios de adsorção, não foram observadas mudanças na

concentração da enzima livre no sobrenadante, o mesmo perfil também foi encontrado por Zheng *et al.* (2007). Esses resultados estão de acordo com os encontrado nesse trabalho para a adsorção da enzima β -glicosidade em Avicel. Em contrapartida, muitos pesquisadores ainda reportam que a enzima β -glicosidase adsorve sobre materiais lignocelulósicos e na celulose pura. Para as biomassas lignocelulósicas, a explicação da adsorção está na presença de certa quantidade de lignina onde a β -glicosidase adsorve improdutivamente e muitas vezes irreversivelmente (ZHENG *et al.*, 2007; PAREEK *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2011). Entretanto, para esse trabalho, a adsorção da enzima β -glicosidade foi considerada como nula tanto para a celulose pura quanto para os bagaços pré-tratados (BH e BO), e assim os experimentos de isoterma de adsorção foram descartados para essa enzima.

4.5. Estudo da cinética de adsorção da enzima celulase no bagaço de cana pré-tratado pelo método hidrotérmico e na celulose pura (Avicel) a 4°C

Os ensaios da cinética de adsorção da enzima celulase sobre as biomassas BPTMH e Avicel foram conduzidos a 4°C, na presença ou não da solução de glicose/enzima na razão 250:1. Para esses experimentos seguiu-se a metodologia descrita no item 3.6, onde foram adicionados aos Erlenmeyers o substrato seguido pelo tampão citrato 0,05 M pH 4,8 complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa, juntamente ou não com a solução de glicose para se manter a relação glicose/enzima 250:1, e posteriormente a enzima. Foi utilizada a carga de celulase de 4 mg de proteína/g de substrato (5,5 FPU/g biomassa) para a concentração de 5% m/v de bagaço pré-tratado ou da Avicel.

A escolha da temperatura de 4°C foi devido ao fato que nessa temperatura o processo de adsorção da enzima celulase ocorre sem a presença da reação de hidrólise da celulose (KUMAR e WYMAN, 2009; LI *et al.*, 2012). As duas biomassas foram analisadas a fim de comparação, pois uma é lignificada (BH) e a outa apresenta somente celulose em sua composição (Avicel). Assim, pôde-se estudar a afinidade da enzima pelos os dois diferentes substratos na temperatura de 4°C.

A adição da solução de glicose nestes experimentos foi para analisar se a glicose se comportaria como um inibidor no processo de adsorção, já que a 4°C não há reação e, nas próximas etapas do trabalho a glicose é usada nos experimentos a 50°C para inibir a reação de

hidrólise. A escolha da razão glicose/enzima 250:1 presente nos experimentos de cinética de adsorção foi baseada nos estudos de inibição da celulase, conduzidos por Maurer *et al.* (2012), onde em seus testes, nenhuma atividade enzimática foi observada numa faixa de aproximadamente 100–1000 partes de glicose para 1 parte de enzima em massa, onde utilizou celulase liofilizada em uma solução aquosa de 6000 ppm de glicose. Com isso, Maurer *et al.* (2012) confirmou que a glicose é um inibidor da celulase, não havendo hidrólise na presença desta quantidade do inibidor.

Os gráficos presentes nas Figuras 20 e 21 apresentam os perfis da adsorção da enzima celulase sobre os substratos BH e Avicel, respectivamente. Os resultados indicam que a cinética de adsorção da celulase sobre os substratos foi diferente. Observando a Figura 20 tem-se que o processo da adsorção da enzima celulase no BH foi igual para os ensaios na presença ou não da adição da glicose ao meio reacional. É visto para ambos os perfis que a adsorção atinge o equilíbrio em aproximadamente 2 horas após o início do experimento e que o máximo de enzima adsorvida foi aproximadamente $3,7 \pm 0,04$ mg de enzima/g bagaço.



Figura 20: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado a 4°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm com e sem a adição de glicose,concentração inicial de bagaço 5% (m/v), carga de celulase de 4 mg de proteína/g de bagaço e relação glicose/enzima 250:1.



Figura 21: Cinética da adsorção da celulase na Avicel a 4°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm com e sem a adição de glicose, concentração inicial de bagaço 5% (m/v), carga de celulase de 4 mg de proteína/g de bagaço e relação glicose/enzima 250:1.

Para a Figura 21, o padrão observado pelas curvas do processo de adsorção da celulase sobre a Avicel, na presença ou não da glicose, também foi o mesmo, ou seja, a adição da glicose não interferiu na adsorção da enzima sobre o substrato celulósico. A quantidade de celulase adsorvida alcançou um valor máximo aproximadamente em 10 minutos. Após os 10 minutos, a quantidade de celulase adsorvida na Avicel atingiu um valor de equilíbrio $(3,5 \pm 0,037 \text{ mg/g}$ Avicel), valor próximo ao obtido na reação de adsorção da celulase no BH $(3,7 \pm 0,04 \text{ mg de enzima/g bagaço})$.

Os resultados sugerem que a cinética de adsorção da celulase em Avicel e BH é diferente. O processo da adsorção da enzima sobre a celulose pura (Avicel) ocorreu mais rapidamente do que sobre o material lignocelulósico (BH), de acordo com as cinéticas de adsorção (Figuras 20 e 21). Portanto, esses resultados mostrados para uma mesma concentração de enzima utilizada (0,2 mg de proteína/mL de solução), estão de acordo com os resultados obtidos por Maurer *et al.* (2012). Segundo o pesquisador, a glicose não compete com a celulase pelos sítios ativos presentes na superfície dos substratos celulósicos, e consequentemente, não pertuba a adsorção da celulase na superfície, não afetando as propriedades de adsorção da celulase na superfície, não afetando as propriedades de adsorção da celulase quando complementada como um inibidor na reação de adsorção.

4.6. Avaliação dos efeitos: agitação e concentração de substrato, na cinética de adsorção da celulase em Avicel

As análises realizadas para avaliar o efeito da agitação e da concentração de sólidos no processo da adsorção da enzima celulase no substrato de celulose pura (Avicel) seguiram os passos da metodologia descrita no item 3.6. Foram adicionados aos Erlenmeyers, tampão citrato 0,05 M pH 4,8 complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa juntamente com a solução de glicose para se manter a relação glicose/enzima 250:1, e posteriormente a enzima. Foi utilizada a carga de celulase de 4 mg de proteína/g de substrato (5,5 FPU/g biomassa) nas concentraçãoes de 5% e 10 % (m/v) de Avicel. Além disso, a agitação também foi variada entre 40 rpm e 250 rpm para ambas concentrações de sólidos, na temperatura de 50° C.

Nos gráficos (Figuras 22a e b), observa-se os perfis cinéticos de adsorção da celulase sobre Avicel com variação da agitação (40, 100, 150, 200 e 250 rpm) para as concentrações de 5% e 10% (m/v) de sólidos respectivamente.



(a)



(b)

Figura 22: Cinética da adsorção da celulase na Avicel sob as agitações (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) a 50°C , 4 mg de celulase/g de Avicel (a) com concentração inicial de Avicel de 5% (m/v) e (b) com concentração inicial de Avicel de 10% (m/v).

De forma geral, para as duas concentrações de sólidos (5% e 10%) m/v, o valor máximo de celulase adsorvida foi de aproximadamente 3,5 mg/g Avicel, para as agitações de 100, 150 e 200 rpm. O equilíbrio da adsorção foi atingido nos 10 primeiros minutos, o mesmo tempo necessário, para se atingir o equilíbrio da adsorção quando a temperatura do processo foi de 4°C. Para a menor agitação (40 rpm), observou-se que o máximo de enzima adosorvida foi próximo dos 2,8 \pm 0,22 mg/g Avicel, para ambas concentrações de sólidos (5 e 10%) m/v. Entretanto, os resultados mostraram que na maior agitação (250 rpm), para as duas concentrações de sólidos, a máxima concentração de enzima adosorvida foi em torno de 3,0 mg/g Avicel, valor esse, menor do que o valor encontrado para as agitações de 100, 150 e 200 rpm.

A fim de avaliar estatisticamente se houve diferença significativa entre a quantidade de enzima adsorvida para os diferentes valores de agitação, foi realizado o Teste de Médias de Tukey, com o auxílio do programa Statistica 7.0, com os valores das médias da concentração de enzima adsorvida para as 6 horas totais da cinética de adsorção. Os testes revelaram diferença significativa a 95% de confiança para as agitações de 40 rpm e 100 rpm, na concentração de 5 % (m/v). As agitações 150 e 200 rpm com 5% de sólidos (m/v) foram consideradas, portanto, iguais à agitação de 100 rpm, onde a quantidade de enzima adsorvida foi a máxima (3,45 \pm 0,06 mg/g

Avicel) e as agitações 40 e 250 rpm também foram estatisticamente iguais, onde a quantidade de enzima adsorvida foi aproximadamente 2,9 \pm 0,15 mg/g Avicel). Quando o teste de Tukey foi aplicado para a concentração de 10% de sólidos (m/v), os resultados mostraram que também houve diferença, só que agora para as agitações de 40, 100 e 250 rpm. As menores concentrações de celulase adsorvidas foram para as agitações de 40 e 250 rpm (2,76 \pm 0,24 mg/g Avicel e 3,0 \pm 0,15 mg/g Avicel), enquanto que, para as agitações de 100, 150 e 200 rpm a concentração de enzima adsorvida aumentou para 3,64 \pm 0,07 mg/g Avicel.

A maior velocidade utilizada (250 rpm) para os testes, mostrou efeito negativo na adsorção para as duas concentrações de sólidos (5 e 10%) m/v. O aumento drástico na agitação em processos enzimáticos é sugerido na literatura (KIM *et al.*, 1982) como um fator que causa ligeira redução na adsorção. Kim *et al.* (1982) concluiram em seus estudos que as celulases podem ser desativadas ao estarem expostas na interface ar-líquido ou por criação de bolhas de ar no meio reacional. Assim, com os resultados dos pesquisadores, os dados obtidos através da Figura 22a e b ficam coerentes, onde o efeito da agitação é positivo somente até uma determinada agitação. Com o aumento na velocidade da agitação de 150 para 250 rpm, a consequencia foi negativa, onde o efeito de desnaturação enzimática pela agitação foi superior à melhora obtida na distribuição das enzimas no meio reacional.

No intuito de se avaliar a influência da carga de sólidos na cinética de adsorção foram plotadas os perfis cinéticos de celulase adsorvida/g Avicel nas concentrações de 5% e 10% (m/v) sob as principais agitações, aquelas que tiveram efeito positivo e aumentaram a capacidade de adsorção da celulase (100, 150 e 200 rpm), respectivamente (Figura 23a, b e c). O tempo necessário onde se atingiu a máxima capacidade de adsorção foi o mesmo para todos os perfis mostrados (Figura 23a, b e c), em torno dos primeiros 10 minutos, mesmo tempo obtido em estudos realizados para a adsorção da celulase em celulose pura Avicel pelos pesquisadores KUMAR e WYMAN (2009). Através da Figura 23a, b e c, os perfis de adsorção da celulase na Avicel (5% e 10%) foram muito próximos, mesmo aumentando concentração de sólidos. Em estudo anterior, Wang *et al.* (2011) chegaram a uma conclusão diferente da obtida no presente trabalho, concluindo que a adsorção da celulase em Avicel (em mg/g substrato) era infuenciada pela concentração de substrato, sendo maior com baixa concentração (1%) e menor com alta concentração (5%). Entretanto, como estes autores trabalharam com agitação baixa (40 rpm), provavelmente houve influência da etapa de transferência de massa. Desta forma, conclui-se que

a agitação deve ser mantida alta o suficiente para que a etapa de transferência de massa não seja a etapa limitante para o processo de adsorção das enzimas e, neste caso, como era de se esperar, a quantidade de enzima adsorvida por massa de substrato é independente da concentração de substrato.





(c)

Figura 23: Cinética da adsorção da celulase em Avicel à 50°C, sob duas concentrações iniciais de bagaço (5% e 10 % m/v) com carga de celulase de 4 mg de proteína/g Avicel e sob as diferentes agitações: (a) 100 rpm, (b) 150 rpm e (c) 200 rpm.

4.7. Avaliação do efeito da agitação e da concentração de substrato na cinética de adsorção da celulase em bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico

Para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmico (BH), também foram realizadas as análises para avaliar o efeito da agitação e da concentração de sólidos no processo de adsorção da enzima celulase. Seguiram-se os passos da metodologia que está descrita no item 3.6. Para isso, foram adicionados aos Erlenmeyers, tampão citrato 0,05 M pH 4,8 complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa juntamente com a solução de glicose, para se manter a relaçao glicose/enzima 250:1 e posteriormente, a enzima. Foi utilizada a carga de celulase de 4 mg de proteína/g de substrato (5,5 FPU/g biomassa) nas concentraçãoes de 5% e 10 % (m/v) de BH. Além disso, a agitação também foi variada de 40 rpm a 250 rpm para ambas as concentrações de sólidos na temperatura de 50° C.

As cinéticas de adsorção da enzima celulase com variação da agitação estão dispostas na Figura 24a e b para as concentrações de sólidos, de 5% e 10% m/v, respectivamente.



Figura 24: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado sob diferentes agitações (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) a 50°C, 4 mg de celulase/g de substrato (a) com concentração inicial de bagaço de 5% (m/v) e (b) 10% (m/v).

O aumento da agitação proporcionou em ambas as concentrações de sólidos (5% e 10%) melhoras na capacidade adsortiva. Para 10% de sólidos (m/v), o valor máximo da enzima celulase adsorvida foi de aproximadamente $3,75 \pm 0,03$ mg/g BH, o mesmo valor encontrado para

a menor concentração de sólido (5%). O equilíbrio da adsorção para ambas as concentrações foi alcançado após 2 horas de reação, diferentemente da adsorção em Avicel, onde o tempo necessário para atingir o equilíbrio foi de 10 min, com adsorção máxima de 3, $64 \pm 0,076$ mg de celulase/g Avicel.

Para uma melhor compreenssão da influência da agitação na concentração de sólidos, analisaram-se estatisticamente os ensaios, como já descritos na seção anterior (4.8). Os testes de Tukey revelaram diferença significativa a 95% de confiança quando se aumentou a agitação de 40 para 100 rpm, na concentração de 5% (m/v). Entretanto quando a agitação passou de 100 para 250 rpm, novamente não foi observada melhora significativa na adsorção. Pelas médias obtidas através dos testes das cinéticas de adsorção da celulase a 10% de sólidos (m/v), o teste de Tukey mostrou que houve diferença significativa a 95% de confiaça, da menor agitação (40 rpm) para a maior agitação (250 rpm). Para a maior velocidade (250 rpm), contudo, a quantidade máxima de enzima adsorvida que foi alcançada nas agitações de 150 e 200 rpm, diminuiu de 3,75 \pm 0,03 mg/g BH para aproximadamente 3,5 \pm 0,07 mg/g BH. Esse carater negativo na adsorção foi o mesmo obtido para a Avicel, onde um aumento muito grande na velocidade da agitação provavelmente levou ao desnaturamento das enzimas, o que consequentemente, causou uma redução na capacidade da adsorção.

Para uma melhor vizualização do efeito da agitação no aumento da concentração de sólidos no processo de adsorção da celulase, foram plotados os perfis cinéticos de celulase adsorvida/g BH nas concentrações de 5% e 10% m/v, sob as principais agitações, aquelas que mostraram efeito positivo sob a capacidade de adsorção da celulase (100, 150 e 200 rpm). A Figura 25 (a, b e c) mostra os gráficos dos perfis cinéticos de adsorção. Os resultados revelam que, o tempo necessário para atingir a capacidade máxima de adsorção foi igual para todas as agitações, após as 2 horas iniciais da reação, valor esse diferente dos encontrados na literatura, onde alguns pesquisadores relatam que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio da adsorção em substratos lignocelulosicos, é superior às 2h, chegando a 8 h (ZHENG, 2007), e outros, relatam que o equilíbrio da adsorção da celulase leva menos de 2 h (KUMAR & WYMAN, 2009). Ou seja, o tempo para que o equilíbrio de adsorção seja estabelecido pode variar para cada substrato empregado e para o pré-tratamento utilizado, além das condições operacionais empregadas, como temperatura e agitação.

80

Pelos gráficos, Figura 25 (a, b e c), os perfis de adsorção da celulase no BH (5% e 10%) mostram-se bem distintos. Na Figura 25a, observa-se que houve influência da etapa de transferência de massa quando a concentração de sólidos passou de 5% para 10% (m/v) sob a agitação de 100 rpm, indicando que a agitação não foi suficiente na distribuição das enzimas sobre o substrato. Assim, a capacidade máxima de adsorção foi menor para a maior concentração de sólidos (aproximadamente 3,0 mg de celulase/g BH), enquanto que na menor concentração de sólidos (5%) m/v, o máximo de enzima adsorvido foi aproximadamente 3,75 \pm 0,001 mg/g BH. Todavia, quando se aumentou a agitação para 150 e 200 rpm (Figura 25b e 25c respectivamente), a capacidade máxima de adsorção aumentou, e foi igual para ambas concentrações de sólidos, que adsorveram cerca de 3,75 \pm 0,01 mg de celulase/g BH. Sendo assim, é evidente que, para altas concentrações de sólidos (10%) m/v, a agitação é um fator limitante no processo de adsorção da celulase de *Trichoderma reseei*.







Figura 25: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado a 50°C, sob duas concentrações iniciais de bagaço (5% e 10 % m/v), com 4 mg de proteína/g de bagaço e sob as diferentes agitações: (a) 100 rpm, (b) 150 rpm e (c) 200 rpm.

4.8. Avaliação do efeito da agitação e da concentração de substrato na cinética de adsorção da celulase em bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento organossolve

Nessa seção, serão analisados os resultados dos experimentos com bagaço de cana-deaçúcar pré-tratado organossolve (BO), esses experimentos só diferem dos já discutidos nas seções 4.8 (Avicel) e 4.9 (bagaço pré-tratado hidrotérmico) pelo substrato utilizado.

Observando os gráficos presentes na Figura 26 (a e b), podem-se avaliar os perfis cinéticos de adsorção da celulase em duas concentrações iniciais de sólidos (5% e 10%) m/v e com variação da agitação. Para a concentração de 5% de sólidos (m/v), o aumento na agitação para velocidade de 150 rpm proporcionou melhor mistura entre o substrato e a enzima, e assim, melhorou a capacidade de adsorção durante a reação. A quantidade máxima de enzima adsorvida atingiu o equilíbrio próximo das 3 horas após o início da reação, e foi de aproximadamente 3,80 \pm 0,04 mg de celulase/g BO. Quando a concentração de substrato duplicou e passou a ser 10% de sólidos (m/v), o mesmo comportamento foi observado. Para a agitação de 150 rpm, a quantidade máxima de enzima adsorvida foi de aproximadamente 3,75 \pm 0,033 mg de celulase/g BO. Mesmo aumentando a velocidade da agitação para 200 rpm e posteriormente 250 rpm não observou-se melhora significativa no processo da adorção.

Estatisticamente, para 5% de sólidos (m/v), não houve diferença significativa a 95% de confiança para as agitações de 40 e 100 rpm, onde o máximo de celulase adsorvida, manteve-se próximo dos 3,14 \pm 0,21 mg/g BO. Já para as demais agitações (150, 200 e 250 rpm) a diferença encontrada foi significativa, e apontou que a melhor velocidade testada foi da agitação de 150 rpm, que teve a quantidade máxima de enzima adsorvida perto dos 3,8 \pm 0,04 mg de celulase/g BO. As velocidades de 200 e 250 rpm exibiram perfis diferentes, com menores quantidades de celulase adsorvida, fenômeno já analisado e discutido nas seções anteriores (4.8 e 4.9), onde o aumento na velocidade da agitação provavelmente levou ao desnaturamento enzimático. Para 10% de sólidos (m/v), os testes de Tukey realizados mostraram que, mesmo nas menores velocidades testadas (40 e 100 rpm) foi possível aumentar a quantidade máxima de celulase adsorvida em até 25%. Contudo, essa quantidade máxima de enzima adsorvida da agitação para 150, 200 e

250 rpm, velocidades essas, que não mostraram diferença significativa a 95% de confiança entre elas.





Figura 26: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado sob diferentes agitações (40 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) a 50°C, 4 mg de celulase/g de substrato, (a) com concentração inicial de bagaço de 5% (m/v) e (b) de 10% (m/v).

3

Tempo (h)

5

6

4

0,5

0,0

ò

1

2
O efeito no aumento da concentração de sólidos, combinado à variação na velocidade de agitação fica mais evidente analisando-se a Figura 27 (a, b e c), onde foram plotados os perfis cinéticos de enzima adsorvida nas concentrações iniciais de 5% e 10% m/v. Pelos gráficos (Figura 27 a, b e c), constata-se que, para o BO o aumento na velocidade de agitação proporcionou grande melhora no processo da adsorção, onde, a quantidade máxima de celulase adsorvida foi a mesma para ambas as concentrações de sólidos (5% e 10%) m/v para a velocidade de agitação de 150 rpm.







Figura 27: Cinética da adsorção da celulase no bagaço pré-tratado a 50°C, sob duas concentrações iniciais de bagaço (5% e 10 % m/v), com carga de celulase de 4 mg de proteína/g de bagaço e sob as diferentes agitações: (a) 100 rpm, (b) 150 rpm e (c) 200 rpm.

O perfil cinético de adsorção na melhor agitação testada (Figura 27 b) apresenta ser parecido com a cinética de adsorção do bagaço pré-tratado hidrotérmico (seção 4.9), onde o tempo necessário para que se atingisse o equilíbrio de adsorção foi de aproximadamente 2 h após

o início da reação. Esse evento é explicado principalmente pela característica do substrato, pois os dois são substratos lignocelulósicos, o que não se pode dizer sobre a cinética de adsorção da celulase na Avicel.

Ainda que a celulose Avicel e os bagaços pré-tratados sejam substratos com características estruturais diferentes, também houve uma diferença na granulometria. A Avicel utilizada nos experimentos possuia diâmetro de partícula de aproximadamente 50 µm, enquanto que o bagaço in natura possuia diâmetro inferior a 0,5 mm. Samaniuk *et al.* (2011) demonstraram em sua pesquisa que, quanto menor a granulometria da partícula, mais fácil a agitação no processo. Sendo assim, o fato do tamanho da partícula da Avicel ser menor que a do bagaço, possibilitou uma melhor distribuição das enzimas na solução para os ensaios com Avicel e, consequentemente a velocidade da agitação não teve inflência como a observada nos ensaios com os bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados.

4.9. Avaliação das isotermas de adsorção da celulase nas três biomassas: Avicel e bagaço de cana-de-açúcar submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve

As isotermas de adsorção foram determinadas após os experimentos de cinética de adsorção da celulase sobre os diferentes substratos. O estudo cinético foi primeiramente executado para que se pudesse determinar o tempo de equilíbrio da adsorção. Com isso, foram encontrados para todos os substratos, nos perfis cinéticos de adsorção da celulase, dois platôs, indicando duas fases. Uma fase inicial e mais rápida de adsorção, e uma fase secundária e lenta, onde o equilíbrio da adsorção foi atingido. O tempo para alcançar o equilíbrio foi diferente para os substratos. Para a celulose pura (Avicel) o tempo necessário foi de 10 minutos, enquanto que para os dois substratos lignocelulósicos (BH e BO) o tempo para que se atingisse o equilíbrio da adsorção da celulase foi de aproximadamente 2 horas.

Baseado nesses estudos, o tempo de contato entre a enzima celulase e o substrato foi fixado. Para a Avicel, fixou-se em 30 minutos e para os bagaços (BH e BO) fixou-se em 3 h o tempo de contato. Esses tempos determinados para as isotermas de adsorção da celulase foram para assegurar que o equilíbrio da adsorção fosse atingido. Não se determinou as isotermas de

adsorção para a enzima β -glicosidade, pois essa não adsorveu em nenhum substrato nos ensaios das cinéticas de adsorção.

Assim sendo, para determinar a isoterma de adsorção para os diferentes substratos, trabalhou-se com 5% de sólidos (m/v) e com agitação de 150 rpm, suficiente para que a concentração de sólidos não influencie a adsorção devido à limitações de transferência de massa. Para isso, os passos descritos no item 3.8 foram seguidos. A quantidade de proteína adsorvida ao substrato foi calculada pela diferença entre proteína livre na solução e proteína total adicionada inicialmente ao meio da reação. Os dados experimentais foram ajustados para a isoterma de Langmuir:

$$E_{ad} = \frac{E_{\max}K_p E_f}{1 + K_p E_f} \tag{4.1}$$

Onde, E_{ad} é a enzima adsorvida (mg ou µmol de enzima/g de substrato); E_{max} é a adsorção máxima de enzima por g de substrato (mg ou µmol enzima/g substrato); E_f é a concentração de enzima livre (mg ou µmol enzima/mL) e K_p é a constante de equilibrio da adsorção (mL/mg ou µmol de enzima) (ZHENG, 2007). Se fizermos uma analogia com a equação de Michaelis – Menten ou com a equação de Monod podemos interpretar 1/Kp como o valor da enzima livre (E_f) para a qual a enzima adsorvida (E_{ad}) é metade da máxima ($E_{máx}$)

A isoterma de Langmuir foi escolhida para esse trabalho porque tem sido abrangentemente usada para descrever a adsorção de enzimas do complexo celulolítico, fornecendo bom ajuste aos dados experimentais na maioria dos casos estudados (KUMAR e WYMAN, 2009; QI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2013).

Neste trabalho, foi examinada a adsorção da celulase a 4°C e a 50°C. Essas temperaturas foram escolhidas pois a maioria dos trabalhos com adsorção de celulases em substratos puramente celulósicos e lignocelulósicos foi conduzida à temperatura de 4°C, onde se estuda o fenômeno de adsorção sem a presença da hidrólise da celulose (POLONEN *et al.*, 2004; KUMAR e WYMAN, 2008; PEREEK *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Contudo, a temperatura de 50°C é a temperatura que se conduz a hidrólise enzimática dos materiais celulósicos, e a temperatura é um dos fatores que mais afeta o processo de adsorção (KAYA *et al.*, 1994). Portanto, as isotermas de adsorção devem ser determinadas a 50°C para representar fielmente o mecanismo de adsorção durante a hidrólise enzimática da celulose.

Para que a temperatura de 50°C fosse utilizada na reação de adsorção foi adicionada uma solução de glicose (Figuras 28 a, 29 a, 30 a, 31 a e 32 a) na razão glicose/celulase 100:1. A solução de glicose foi adicionada aos experimentos a 4°C também, para que se pudesse avaliar o comportamento da isoterma, e comparar os perfis da adsorção em ambas temperaturas, além de avaliar como a glicose, no papel de um inibidor, interfere no processo. A relação glicose/celulase 100:1 foi escolhida, porque, segundo Maurer *et al.* (2012), esta é a menor concentração de glicose na qual não há atividade enzimática.

Os parâmetros (E_{max} e K_p) obtidos, descritos na Tabela 13, juntamente com os gráficos presentes nas Figuras de 28 a 32, indicam que as isotermas de adsorção para os diferentes substratos foram bem ajustadas ao modelo de adsorção de Langmuir. Determinaram-se os parâmetros do modelo de Langmuir pelo ajuste dos dados experimentais de adsorção da celulase, com a Equação 4.1 por meio do software OriginPro 8.0 (OriginLab,Northampton, MA, USA).

Substrato	Temperatura (°C)	E _{max} (mg/g)	K _p (mL/mg)	\mathbf{R}^2
Avicel c/glicose	4	$15,89 \pm 0,62$	$7,78 \pm 1,62$	0,956
Avicel s/glicose	4	$42,09 \pm 1,78$	$4,23 \pm 0,71$	0,948
Avicel c/glicose	50	$17,41 \pm 0,85$	$4,\!46\pm0,\!87$	0,962
Avicel s/glicose	50	$17,46 \pm 0,43$	$5,57 \pm 0,64$	0,983
BH c/glicose	4	$10,10 \pm 0,33$	$18,19 \pm 4,29$	0,954
BH s/glicose	4	15,81 ± 0,58	$9,26 \pm 2,10$	0,954
BH c/glicose	50	36,93 ± 2,73	$1,28 \pm 0,25$	0,963
BH s/glicose	50	$20,04 \pm 1,70$	$13,70 \pm 5,62$	0,844
BO c/glicose	50	28,11 ± 1,67	$2,33 \pm 0,45$	0,957
BO s/glicose	50	$30,48 \pm 2,36$	$1,64 \pm 0,36$	0,957

Tabela 13: Constantes de adsorção de Langmuir para os diferentes substratos (dados experimentais nas Figuras 28 a 32).

* Faixa da concentração inicial de celulase em solução: 0,1-4,5 mg/mL. Concentração de substrato foi de 5% (m/v) em todos os ensaios. Agitação foi de 150 rpm.

Conforme os dados listados na Tabela 13, pode-se dizer mais uma vez que houve diferença entre os substratos, e que a adsorção máxima também varia com o aumento da temperatura e com a presença de glicose.



Figura 28: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em Avicel a 4°C, sob agitação de 150 rpm, por 30 minutos, na concentração inicial de 5% de Avicel (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose.



Figura 29: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em Avicel a 50°C, sob agitação de 150 rpm, por 30 minutos, na concentração inicial de 5% de Avicel (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose.

Analisando os resultados para Avicel a 4ºC podemos avaliar se a glicose inibe a adsorção de celulase. Como nesta temperatura não há reação de hidrólise, o resultado obtido sem glicose

deve ser o resultado correto. No entanto, nota-se que a quantidade máxima de enzima adsorvida na presença de glicose foi praticamente um terço do valor obtido quando glicose não foi adicionada ao meio (E_{max} =15,89 mg de proteína/g de Avicel e E_{max} =42,09 mg de proteína/g de Avicel). Além disso, a constante de equilíbro de adsorção (K_p) para Avicel sem glicose também é menor, ambos resultados indicando um efeito inibitório da glicose na adsorção, diferentemente do que foi afirmado no trabalho de MAURER *et al.* (2012). A inibição da adsorção pela glicose havia sido reportada no trabalho de STUTZENBERGER e LINTZ (1986), razão pela qual estes ensaios foram realizados no presente trabalho.

Anteriormente já havia sido feito o estudo da cinética de adsorção a 4°C na presença e ausência de glicose (item 4.7, Figuras 20 e 21), que não havia mostrado inibição da adsorção por glicose. A concentração de enzimas usada, no entanto, foi de 4 mg/g de biomassa e a concentração de biomassa 5%, o que correponde a uma concentração de 0,2 mg enzima/mL. Na determinação das isotermas esta concentração variou de 0,1 a 4,5 mg/mL, e, como a glicose é adicionada na razão de 100:1 (glicose/celulase), houve adição de quantidade bem maior de glicose, justificando a inibição neste caso e não no estudo anterior. Quando avaliamos os parâmetros para Avicel a 50°C com e sem glicose, vemos que parece não haver interferência desta substância nos parâmetros. No entanto, a 50°C há hidrólise quando não se adiciona glicose, com consequente diminuição da massa de adsorvente e dessorção das enzimas, o que faz com que o resultado sem adição de glicose não seja confiável. ZHENG et al. (2013A) estudaram a adsorção de celulase sobre Avicel a 50°C sem adição de glicose e mostraram que houve uma rápida adsorção seguida de dessorção de aproximadamente 30% da quantidade de enzima devida a hidrólise, sendo o equilíbrio atingido no valor mais baixo de enzima adsorvida. Assim, provavelmente ambos valores de E_{max} encontrados (com e sem adição de glicose) devem ser mais baixos do que o real, no caso com adição de glicose devido à inibição da adsorção e no caso sem adição devido à dessorção.

Os resultados listados nesse trabalho, Tabela 13, para Avicel a 4°C sem glicose e a 50°C com glicose (E_{max} = 42,09 mg/g de Avicel e E_{max} =17,46 mg/g de Avicel, respectivamente), são similares a resultados já reportados anteriormente por outros autores (ZHENG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 1994), onde os valores para E_{max} possuem a mesma ordem de grandeza, e diminuíram com o aumento da temperatura. Este decréscimo na capacidade de

adsorção com a temperatura é o que se espera para processos que seguem o modelo de Langmuir (ZHENG *et al.*, 2013).

Para o bagaço pré-tratado hidrotérmico (BH), as Figuras 30 (a e b) e 31 (a e b), descrevem o efeito do aumento da temperatura e da adição de glicose na adsorção. O mesmo fenômeno de inibição encontrado para Avicel, embora em menor magnitude, pode ser notado quando avaliamos os parâmetros para BH a 4°C com e sem glicose, tendo a constante de adsorção (E_{max}) passado de 10,10 mg/g de BH para 15,81 mg/g de BH, e o valor de K_p de 18,19 para 9,26 mL/mg, respectivamente.





(b)

Figura 30: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BH a 4°C, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas, com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose.





Figura 31: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BH a 50°C e, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas, com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose.

Já para os ensaios da isoterma a 50°C, percebe-se que o parâmetro E_{max} foi maior quando se adicionou glicose ao substrato, nesse caso, o E_{max} com adição de glicose foi igual a 36,93 mg/g de BH, e para o ensaio na ausência da solução de glicose o E_{max} foi igual a 20,04 mg/g de BH. Assim como na adsorção em Avicel, provavelmente a diminuição de E_{max} na ausência de glicose é causada pela dessorção das enzimas com a hidrólise de parte da biomassa. Como os pontos experimentais eram retirados após 3 h (tempo determinado como de equilíbrio nos estudos de cinética), uma quantidade considerável do bagaço deve ter sido hidrolisada neste caso, especialmente para as concentrações de enzima mais altas. Como mostrado nos ensaios a 4°C, o efeito da inibição por glicose parece ser menos importante no caso do BH do que quando o substrato é Avicel, de forma que o valor de E_{max} determinado com adição de glicose deve estar próximo do valor real.

Ao contrário da adsorção em Avicel, onde a capacidade de adorção diminuiu com a temperatura, no caso do BH a capacidade de adsorção aumentou bastante com a temperatura. Este comportamento foi o mesmo obtido por ZHENG *et al.* (2013) para isolados de lignina obtidos através de hidrólise de biomassas lignocelulósicas submetidas a diferentes pré-tratamentos.

No bagaço pré-tratado organossolve, somente a temperatura de 50°C foi analisada. Podese notar da Tabela 13 que o valor de E_{max} foi ligeiramente maior sem adição de glicose, o que parece indicar que, neste caso, o efeito da inibição da adsorção pela glicose foi maior do que o efeito causado pela dessorção devida à hidrólise.

(a)



Figura 32: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em BO a 50°C, sob agitação de 150 rpm, por 3 horas com concentração inicial de 5% bagaço (m/v), celulase, 0,1-4,5 mg/mL, (a) com adição de glicose e (b) sem adição de glicose.

Ao compararmos os valores de E_{max} para os 3 substratos, nota-se que, quanto menor a quantidade de lignina na biomassa, menor a capacidade máxima de adsorção. Para Avicel, que não possui lignina em sua composição, o valor de E_{max} foi de 17,41 ± 0,85 mg/g Avicel; para BO, que possui 4,42% de lignina, $E_{max}=28,11 \pm 1,67$ mg/g de BO; e, para BH, com cerca de 31,97% de lignina em sua composição, o E_{max} foi de 36,93 ± 2,73 mg/g de BH; todos para adsorção a 50°C com adição de glicose. A quantidade máxima de enzima adicionada nos ensaios de determinação da isoterma foi de 4.5 mg/mL, equivalente a 90 mg/g biomassa.

Nota-se, também, pela análise das isotermas, que estas diferenças em quantidade adsorvida começam a aparecer apenas para altas concentrações de enzima. Até 1 mg/mL (20 mg/g de biomassa) de enzima total, a quantidade adsorvida nas 3 biomassas calculada pelas isotermas é semelhante, de 11.4, 12.2 e 12.8 mg/g de biomassa para Avicel, BH e BO, respectivamente. A partir desta quantidade de enzima a adsorção das biomassas lignocelulósicas se torna maior do que para Avicel, permanecendo semelhantes até aproximadamente 2 mg/mL (40 mg/g biomassa) de enzima total. Para esta concentração de enzimas a quantidade adsorvida é de 20.5 e 19.8 mg/g de biomassa para BH e BO, respectivamente.

Alguns pesquisadores afirmam que a diferença da adsorção sobre os materiais lignocelulósicos é causada pela quantidade de lignina presente nos materiais (ZHENG *et al.*, 2007; QUI *et al.*, 2011; HEISS-BLANQUET *et al.*, 2011). Com isso, os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os da literatura, onde a deslignificação nem sempre leva a uma maior adsorção enzimática em bagaço de cana-de-açúcar e outros materiais que apresentam lignina em sua composição.

4.10. Avaliação das cinética e isoterma de adsorção da celulase em isolado de lignina proveniente do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico

A adsorção da celulase também foi investigada sobre o isolado de lignina, pois tem sido muito estudada em trabalhos recentes (PALONEN *et al.*, 2004; BORJESSON *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; LOU *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Essas pesquisas sugerem a adsorção não produtiva das enzimas celulases de *Trichoderma reesei* na lignina. Os estudos apontam que as interações da celulase com a lignina podem ser através de ligações fracas, como as eletrostáticas (BERLIN *et al.*, 2006; LOU *et al.*, 20013), hidrofóbicas (ERIKSSON *et al.*,

2002) e por ligações de hidrogênio (SEWALT *et al.*, 1997). Com a adsorção improdutiva das enzimas do complexo celulolítico sobre a lignina, o rendimento da hidrólise enzimática diminui, e consequentemente, dosagens maiores de celulases são requeridas para tornar a sacarificação eficiênte, o que torna o processo mais dispendioso (BORJESSON *et al.*, 2007; ZHU & ZHUANG, 2012).

Os ensaios de cinética e isoterma de adsorção da celulase no isolado de lignina nesse trabalho foram realizados seguindos os passos descritos no item 3.8, somente para a temperatura de 50°C e na presença da solução de glicose/enzima na relação de 100:1.

A cinética de adsorção para o isolado de lignina (IL) foi diferente daquela obtida para todos os outros substratos (Avicel, BH e BO). Primeiro, o tempo de equilíbrio para a celulose pura foi próximo dos 10 min, bem menor do que para o IL, que foi próximo dos 60 min. Já para os outros substratos, o tempo de equílibrio foi maior que 60 min, próximo dos 120 min. Além disso, o perfil cinético de adsorção no IL (Figura 33) também se diferenciou em relação aos demais substratos.



Figura 33: Cinética da adsorção da celulase no isolado de lignina em 50°C, pH 4,8 e agitação de 150 rpm sob a concentração inicial de isolado de lignina (5% m/v) com carga de celulase de 4 mg de proteína/g de isolado de lignina.

A quantidade de celulase adsorvida no IL atingiu um valor máximo de equilíbrio próximo dos $2,75 \pm 0,03$ mg/ g de IL quando foram adicionadas 4mg de enzima/g de biomassa. Comparando com os valores obtidos para o BH e para o BO, que foram de aproximadamente 3,75 mg/g de bagaço, nota-se que a adsorção na lignina é significativa frente à adsorção na celulase. Ao compararmos este resultado com o trabalho de ZHENG *et al.* (2013), que avaliou a adsorção de celulases em Avicel e em isolados de lignina provenientes de diferentes biomassas e pré-tratamentos (pré-tratamento ácido ou por explosão a vapor de palha de milho e pré-tratamento por explosão a vapor de palha de arroz), vemos que os resultados são diferentes. ZHENG *et al.* (2013) encontraram o equilíbrio na cinética de adsorção em 1h na temperatura de 4°C, mas quando a temperatura foi de 50°C o equilíbrio só foi atingido em 12h, resultado bem diferente do obtido neste trabalho.

Após a determinação do tempo necessário para se atingir o equilíbrio da adsorção da celulase no IL, a isoterma de adsorção foi determinada. A Tabela 14 apresenta resumidamente os resultados dos parâmetros ($E_{max} e K_p$) obtidos. O gráfico presente na Figura 34 indica que a isoterma de adsorção da celulase sobre o IL foi bem ajustada ao modelo de adsorção de Langmuir.

Substrato	Temperatura (°C)	E _{max} (mg/g)	K _p (mL/mg)	R ²
Isolado de Lignina c/glicose	50	$11,92 \pm 0,760$	$13,27 \pm 6,29$	0,868

Tabela 14: Constantes de adsorção de Langmuir para o isolado de lignina proveniente do BH.

* Faixa da concentração inicial de celulase em solução: 0.1-4,0 mg/mL. Concentração de substrato foi de 5% (m/v) em todos os ensaios.

O valor de capacidade máxima de adsorção (E_{max}) obtido no presente trabalho não é muito diferente do obtido no trabalho de ZHENG *et al.* (2013). Na Figura 34 e Tabela 14, E_{max} é determinado como 11,92 ± 0,760 mg/g IL. No trabalho de ZHENG *et al.* (2013), embora os autores tenham estimado E_{max} em torno de 22 mg/g de IL, ao observarmos os valores experimentais vemos que este valor é enormemente extrapolado, tendo os valores experimentais ficado no máximo em torno de 15 mg/g de IL mesmo para os maiores valores de concentração de enzima considerados (2 mg/mL e 1% de substrato, equivalente a 200 mg/g de substrato; valor bem maior que o máximo do presente trabalho, de 90 mg/g de substrato).

Com os resultados listados da Tabela 14, verifica-se que houve diferença entre os substratos celulósicos e o IL. O isolado de lignina exibiu capacidade de adsorção menor para a enzima celulase do que os demais substratos. A constante de máxima adsorção do IL foi de 11,92

mg de celulase/g de IL, 1,5 vezes menor do que para a Avicel (17,41 mg/g de Avicel), 3 vezes menor que para o BH (36,93 mg/g de BH) e 2 vezes menor que para o BO (28,11 mg/g de BO). Com isso, os resultados sugerem que a celulase tem mais afinidade pelos substratos celulósicos do que pela lignina.

O caso da celulase adsorver em menor proporção no isolado de lignina também foi encontrado por outros pesquisadores, como Seo *et al.* (2011) e Palonen *et al.* (2004), onde mostraram que a enzima celulase tem maior afinidade pela celulose do que pelo isolado de lignina, trabalhando com madeira pré-tratada a 4°C. Em contrapartida, Pareek *et al.* (2013) e Li *et al.* (2012) apresentaram que o isolado de lignina dos materiais lignocelulósicos adsorveu mais celulase que o material pré-tratado e Avicel, na temperatura de 4°C.



Figura 34: Isoterma de Langmuir para a adsorção da celulase em lignina a 50° C e pH 4,8 sob agitação de 150 rpm com adição de glicose por 2 horas com concentração inicial de 5% isolado de lignina (m/v) e celulase, 0,1-4,5 mg/mL.

4.11. Avaliação da hidrólise dos bagaços pré-tratados em concentrações proteícas diferentes da enzima celulase

Para investigar o rendimento da hidrólise enzimática e o comportamento dos materiais pré-tratados com o aumento da concentração protéica da celulase, a conversão dos materiais

lignocelulósicos (BH e BO), usando a celulase comercial (Celluclast 1.5 L Novozymes), com adição de β -glicosidase Novozymes (Sigma) foi realizada em uma incubadora à 150 rpm de agitação, na temperatura de 50°C por 72 h, como detalhado na seção 3.7 da metodologia. Os resultados (Figura 35) são demosntrados em termos de liberação de glicose, em g/L. A concentração de glicose máxima que pode ser obtida baseada na composição em celulose dos dois materiais pré-tratados é de 33.9 g/L para o BH e 48.3 g/L para o BO.





Figura 35: Comparação entre os perfis de liberação de glicose na hidrólise (a) de BH e (b) BO. Os ensaios foram realizados com 5% de sólidos (m/v), utilizando diferentes concentrações protéicas da enzima celulase (Celluclast 1.5 L) com adição de 25 CBU/g de bagaço da enzima β -glicosidase (Sigma).

Para o bagaço pré-tratado hidrotérmico (Figura 35 a), para a menor concentração de enzimas usada (0.36 mg/mL) uma conversão de aproximadamente 53% foi obtida, enquanto que para o bagaço pré-tratado organossolve a conversão foi de aproximadamente 78%. Pelas isotermas, a quantidade de enzima adsorvida para os dois materiais é semelhante nesta concentração, sendo de 4.8 e 5.2 mg/g de biomassa para BH e BO, respectivamente.

Para concentração de enzima de 1.5 mg/mL, as conversões são de aproximadamente 71% e 87% para BH e BO, enquanto as concentrações adsorvidas são de 16.8 e 17 mg/g biomassa, respectivamente, calculadas pelas isotermas. Embora nestas concentrações de enzima as duas biomassas adsorvam quantidades semelhantes de enzima, a quantidade de lignina no BH é bem mais alta, o que provavelmente é parte do motivo porque esta biomassa tem menor conversão. Na concentração de 1.5 mg/mL de enzima a quantidade adsorvida no isolado de lignina calculada pela isoterma é de 5.8 mg enzima/g IL.

Para o bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico (BH), aumentar a concentração de enzimas acima de 1.5 mg/mL não tem influência na conversão, que se mantém em torno de 71%, embora a capacidade máxima de adsorção não tenha sido atingida. Na verdade a capacidade

máxima de 36.93 mg/g BPTMH não é atingida nem na concentração máxima considerada, de 6.0 mg/mL, na qual a concentração adsorvida calculada pela isoterma é de 31.4 mg enzima/g BH.

Para o bagaço submetido ao pré-tratamento organossolve a conversão continua aumentando com o aumento da concentração de enzima, chegando a 98% com 5.0 mg/mL de enzima e 100% com 8.0 mg/mL de enzima. Nesta concentração a quantidade de enzima adsorvida calculada pela isoterma é praticamente igual à máxima, 26.4 mg/g BO (E_{max} = 28,11 ± 1,67 mg/g bagaço).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a obtenção dos perfis cinéticos das enzimas comerciais celulase e β -glicosidase para os diferentes materiais celulósicos e para o isolado de lignina, bem como a obtenção dos parâmetros (E_{max} e K_p) das isotermas de adsorção, foi possível entender que a adsorção da celulase é fortemente influenciada por propriedades físico-químicas do substrato e pelos parâmetros das reações, tais como, a temperatura e a transferência de massa. E com isso, também foi possível entender um pouco melhor sobre o mecanismo do processo da hidrólise enzimática e o quanto a adsorção das enzimas sobre os materias interfere nesse processo. De maneira resumida, as conclusões a respeito dos resultados obtidos foram descritas a baixo:

- Os resultados da composição química encontram-se dentro da faixa média encontrada na literatura, onde a composição foi diferente para os dois materiais pré-tratados. O bagaço pré-tratado hidrotérmico apresentou alto teor de lignina, praticamente não teve remoção de lignina após o pré-tratamento. Já o bagaço pré-tratado organossolve foi deslignificado quase que totalmente, apresentando 4,42% de lignina em sua composição. As figuras de MEV mostram como o pré-tratamento organossolve foi mais eficiente, produziu uma desintegração maior da fibra lignocelulósica, provavelmente pela maior remoção da lignina;
- Em relação aos estudos da cinética de adsorção da celulase nos bagaços de cana prétratados (BH e BO), na Avicel e no isolado de lignina observou-se que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio de adsorção do sistema enzima/substrato, é muito menor para a Avicel do que para o isolado de lignina e para os bagaços pré-tatados. Para Avicel o tempo de equilíbrio é alcançado em 10 minutos, enquanto que para o IL o tempo é de 1 h e para os bagaços, após 2 horas do início da reação. Os resultados obtidos com o aumento na concentração de sólidos de 5% para 10% (m/v) não levou a mudanças na relação enzima adsorvida/g de substrato nos perfis da cinética de adsorção para os materiais utilizados, uma vez que a agitação a partir de 150 rpm fosse empregada. Além disso, concluiu-se que a agitação exerce influência significativa no fenômeno de adsorção, onde o aumento da agitação leva a um aumento na adsorção da enzima no substrato, porém a partir de um determinado aumento da velocidade de agitação não foram observadas mudanças significativas nos perfis de enzima adsorvida;

- Os parâmetros E_{max} e K_p obtidos pelo ajuste dos dados experimentais mostraram-se bastante significativos para os materiais. A maior capacidade de adsorção e, consequentemente, uma afinidade maior da enzima celulase sobre o BH foi observada, pois a celulase além de adsorver na celulose, também se adsorve lignina, em menor extensão. Os dados obtidos da isoterma da celulase sobre o isolado de lignina confirmam a adsorção improdutiva da enzima na lignina e mostram como esses estudos da adsorção das enzimas em IL são importantes, porque se torna possível distinguir a adsorção a porções da celulose e frações da lignina;
- O estudo da adsorção com diferentes materiais lignocelulósicos além de Avicel mostrou que muitas vezes as aproximações usadas em trabalhos na literatura, que consideram que a adsorção acontece em menos de 30 minutos (LI et al., 2012, HEISS-BLANQUET et al., 2011, KIM et al., 1994) baseiam suas suposições nos estudos com celulose pura e estas conclusões são bem diferentes para os dois materiais lignocelulósicos estudados neste trabalho;
- Os estudos de adsorção a 50°C mostram que os parâmetros são completamente diferentes daqueles determinados a 4°C, que são maioria na literatura (ZHENG et al., 2013, PAREEK et al., 2013, KAYA et al., 1994, OOSHIMA et al., 1983). Para que os estudos de adsorção possam ser empregados em modelos matemáticos de hidrólise é imprescidível que os parâmetros sejam determinados na temperatura real de hidrólise;
- A adição da solução de glicose na relação glicose/enzima de 100:1 nas isotermas a 4°C mostrou que a capacidade de adsorção da celulase no substrato é afetada. Entretanto, a utilização da glicose como um inibidor de reação nos ensaios de adsorção a 50°C proporcionou uma visão mais realista do processo, com maiores valores de E_{max} em comparação com os experimentos na ausência desta na maior parte dos casos estudados;
- Os resultados das hidrólises também confirmaram a adsorção improdutiva da enzima celulase na lignina, pois o BO (4,42% de lignina) resultou maior rendimento de glicose na hidrólise do que o BH (31,97 % de lignina), mesmo aumentando drasticamente a concentração de enzima adicionada. Os resultados parecem apontar ao fato de que a lignina impede a adsorção da celulase em maior extenção na celulose para liberar mais açúcar.

Para trabalhos futuros, sugere-se maiores estudos empregando enzimas do complexo celulolítico purificadas como estratégia para verificar a adsorção individual dos compomentes sobre o substrato, e assim, analisar a afinidade sobre o material de cada componente enzimático. A obtenção de um isolado de lignina mais puro, proveniente dos bagaços pré-tratados também pode ser investigada, bem como os métodos de dessorção das enzimas do material residual de uma completa hidrólise, a fim de que não ocorra subestimação de adsorção da celulase sobre os isolados de lignina. O uso de aditivos nos estudos de adsorção, tais como, surfactantes e proteínas também pode ser estudado, buscando verificar o quanto esses aditivos interferem no processo de adsorção e se o uso desses pode melhorar de alguma forma o rendimento da hidrólise enzimática dos materiais lignificados.

Referências Bibliográficas

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. LAP-006, 1996.

ALVES, F. F.; BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C., et al. **Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods**. Carbohyd Polym., vol. 82, p. 1097, 2010.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, vol. 101, p.4851–4861, 2010.

ANTAL, M. J. Water: A traditional solvent pregnant with new applications. In: Proceedings of the 12nd International Conference on the Properties of Water and Steam. White H J (Ed.), editor. New York: Begell House, p. 24-32, 1996.

ARBEX, M. A.; CANCADO, J. E. D.; PEREIRA, L. A. A. et al. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. J. Bras. Pneumol., vol. 30, p. 158-175, 2004.

AYALA, O. L. B. Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açucar considerando a produção de etanol. Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

BANSAL, P, et al. **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates**. Biotechnology Advances, vol. 27, p.833–848, 2009.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A., et al. Weak lignin-binding enzymes - A novel approach to improve activity os cellulases for htdrolysis of lignocellulosics. Appl. Biochem. Biotechnol., p. 121-124, 163-170, 2005.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and bglucosidase activities by softwood lignin preparations. J. Biotech., p. 125 198-209, 2006.

BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR: energia para o desenvolvimento sustentável / organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro: BNDES, 316 p., 2008.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. Prog. Polym. Sci., vol. 19, p. 797–841, 1994.

BOMMARIUS, A. S.; KATONA, A.; CHEBEN, S. E., et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. Metab Eng., vol. 6, p. 370–381, 2008.

BöRJESSON, J.; PETERSON, R.; TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocelluloses by poly (ethylene glycol) addition. Enzyme and Microbial Technology, vol. 40, p. 754–762, 2007.

BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. Enzyme Microbial Technol., vol. 24, p. 138-43, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, vol. 72, p. 248-254, 1976.

CAO, N.; XIA, Y.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Production of 2,3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of a fungal cellulase. Appl Biochem Biotech., vol. 63, p.129, 139, 1997.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. Bioresource Technology., vol. 101, 4754–4766, 2010.

CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X, et al. Effect of álcali pretreatment on cellulase hydrolyiss of wheat straw: Kinetic study. Process Biochem., vol. 40, p. 3360-3364, 2005.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na** hidrólise de resíduos agroindustriais. Quim. Nova, vol. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Guia da cana-de-açúcar – Avanço científico beneficia o País. Setembro/2009.

CONVERSE, A. O.; MATSUNO, R.; TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. Biotechnol. Bieng., vol. 32, p. 38-45, 1988.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. Appl Biochem Biotechnol., vol. 84/86, p. 5-37, 2000.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; KIM, C. H, et al. **Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass - poplar wood and newspaper**. Appl Biochem Biotechnol., vol. 94, p. 1-28, 2001.

CHEN, J. C. P. & CHOU, C. Cane Sugar Handbook. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12nd.ed. New York John Wiley & Sons, 1993.

CHEUNG, S. W.; ANDERSON, B.C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. Bioresour. Technol., vol. 59, p. 81–96, 1997.

CHRISTOFOLETTI, G. B. Estudo dos efeitos de etapas de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Mestrado. Faculdade de Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, 2010.

DEEBLE, M. F.; LEE, M. J. Enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates in an attrition bioreactor. Biotechnol Bioeng Symp., vol. 15, p. 277-84, 1985.

DEKKER, R.F.H., WALLIS, A.F.A. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis steam explosion. Biotechnol. Bioeng., vol. 25, n. 12, p. 3027–3048, 1983.

DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. -E. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. Enzyme Microb. Technol., vol. 6, p. 338-340, 1984.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O., et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. Bioresource Technology, vol. 103, p. 152-161, 2012.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWSB, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. Industrial Crops and Products, vol. 33, p. 259–276, 2011.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M. M.; MENDES, F. M.; GÓMEZ, E. O. Characterization of sugarcane bagasse powders. Powder Technology, vol. 214, p. 111–116, 2011.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. **Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review**. Bioresour. Technol., vol. 55, p. 1–33, 1996.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVA, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. Adv. Polym. Sci., vol. 186, p. 1–67, 2005.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. Enzyme and Microbial Technology, vol. 31, p. 353–364, 2002.

EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M.R. Saccharification of steam—exploded poplar wood. Biotech Bioeng, vol. 38, p. 1308-1317, 1991.

FAIX, O., GRUNWALD, C. BEINHOFF, O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWLs) form different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, H-NMR, and UV spectroscopy. Holzforschung, vol. 46, p. 425- 432, 1992.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y-H. Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs. Berlin: Springer, 57 p, 1987.

FAN, L. T.; LEE, Y. H. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetic model. Biotechnol Bioeng., vol. 14, p. 2707-33, 1983.

FAO. FAOSTAT. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: 10 de junho de 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry ultrastructure Reactions. Berlín:Walter de Gruyter, 610 p, 1989.

FERNANDEZ, N., MORCK, R., JOHNSRUD, S. C., KRINGSTAD, K. P. Carbon-13 NMR study on lignin from bagasse. Holzforschung, vol. 44, p. 35- 38, 1990.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. Quim. Nova, vol. 32, n.3, p. 623-638, 2009.

FINGERUT, J.; MEIRELLES, A.J.A.; GUIRARDELLO, R. & COSTA, A.C. Produção de etanol, em Biomassa para Energia. Editores: L.A.B. Cortez e E.O. Gómez, Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2008.

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas, 3 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 744–756, 2002.

FUENTES, L. L. G. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de canade-açúcar e da hidrólise enzimática no pré- tratamento com hidróxido de cálcio. Mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2009.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. Process Biochemistry, vol. 38, p. 1003-1018, 2003.

GEORGES, F. **Caracterização da palha da cana-de-açúcar do Rio Grande do Sul e dos seus produtos de pirólise**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais, Março de 2011.

GHOSE, A. P.; Das K. Advances in Biochemical Engineering, vol. 1. Berlin: Springer, 1971.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. Pure Appl. Chem., vol. 59, p. 257-268, 1987.

GILES, C. H.; MACEWAN, T. H.; NAKHWA, S. N.; SMITH, D. J. Chem. Soc., p. 3973, 1960.

GILES, C. H.; D' SILVA, A. P. D., TRIVEDI, A. S. Surface area determination. London: Butterworth, p. 135- 47, 1970.

GIRARD, D. J.; CONVERSE, A. O. Recovery of cellulose from lignaceous hydrolysis residue. Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 39-40, p. 521-533, 1993.

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

GOMIDE, R. **Operações unitárias: operações de transferência de massa**. 1^a ed. São Paulo: Dag Gráfica e Editora ltda., vol. 4, p. 311–315, 1988.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; ROCHA, G. J. M. e SOUTO-MAIOR, A. M. **Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar**. Química Nova, vol. 32, n° 6, p. 1500–1503, 2009.

GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. Crop Sci., vol. 45, p. 820–831, 2005.

GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. Biotechnol Bioeng., vol. 51, 375- 83, 1996.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. **Optimization of dilute acid pretreatment of biomass**. Biotechnol Bioeng Symp., vol.15, p. 59 e 80, 1985.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulose product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and b-glucosidase activity on the inhibition pattern. Biotechnol Bioeng., vol. 40, p. 71, 1992.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. Biomass and Bioenergy, vol. 28, p. 384–410, 2005.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M. F. Enzyme Microb. Technol., vol. 38, p. 436, 2006.

HEISS-BLANQUET, S.; ZHENG, D.; LOPES FERREIRA, N, et al. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. Bioresource Technology, vol. 102, p. 5938-5946, 2011. HEITZ, M.; CAPEK-MENARD, E.; KOEBERLE, P. G, et al. Fractionation of Populus tremuloides in the pilot plant scale: optimization of steam pretreament conditions using STAKE II technology. Bioresour Technol., vol. 35, p. 23-32, 1991.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, vol. 100, p.10–18, 2009.

HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCKER, D., et al. **Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy**. *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), 1-13, 2007.

HOLTZAPPLE, M. T.; CARAM, H. S.; HUMPHREY, A. E. Determining the inhibition constants of the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. Biotechnol Bioeng., vol. 26, p. 753-7, 1984.

HONG, J.; YE, X.; ZHANG, Y. H. P. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. Langmuir, vol. 23, p.12535–40, 2007.

HUANG, X. L.; PENNER, M. H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. J. Agric. Food Chem., vol. 39, p.2096–2100, 1991.

ITO, J.; FUJITA, Y.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improovement of Cellulose-Degrading Ability of a Yeast Strain Displaying *Trichoderma reeseii* Endoglucanase by Recombination of Cellulose-Binging Domains. Biotechnology Progress., vol. 20, p.688-691. 2004.

KAYA, F.; HEITMANN JR, J. A.; JOYCE, T. W. Cellulase binding to cellulose fibers in high shear fields. Journal of Biotechnology, vol. 36, p.1-10, 1994.

KASTEL'YANOS, O.; SINITSYN, A. P.; VLASENKO, E. Y. Effects of various factors on the kinetics of cellulose hydrolysis by an enzyme preparation from *Penicillium vertuculosum*. Appl Biochem Biotechnol., vol. 31, p.425- 30, 1995.

KLYOSOV, A. A.; RABINOWITCH, M. L. Enzymatic conversion of cellulose to glucose: present state of the art and potential. In: Wingard LB, Jr., Berezin IV, Klyosov AA, editors. Enzyme Engineering: Future Directions. New York: Plenum Press, p.83-165, 1980.

KIM, M. H.; LEE, S. B.; RYU, D. D. Y. Surface deactivation of cellulase and its prevention. Enzyme Microb Technol., vol. 4, p.99–103, 1982.

KIM, D. W.; JEONG, Y. K.; LEE, J. K. Adsorption kinetics of exoglucanase in combination with endoglucanase from Trichoderma viride on microcrystalline cellulose and its influence on synergistic degradation. Enzyme Microb Technol., vol. 16, p.649–58, 1994.

KIM, T. H.; KIM, J. S.; SUNWOO, C, et al. **Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia**. Bioresour Technol., vol. 90, p.39-47, 2003.

KIRCHMAN, D. L.; HENRY, D. L.; DEXTER, S. C. Adsorption of proteins to surfaces in seawater. Mar. Chem., vol. 27, p.201-217, 1989.

KRAULIS, P. J.; CLORE, G. M.; NILGES, M., et al.. Biochemistry, vol. 28, p.7241-57, 1989.

KRISTENSEN, J. B.; BORJESSON, J.; BRUUN, M.; TJERNELD, F.; JORGENSEN, H. Use os surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocelluloses. Enzyme Microb. Technol., 2006.

KRISTENSEN, J.B.; BöRJESSON, J.; BRUUN, M.H.; TJERNELD, F.; JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocelluloses. Enzyme and Microbial Technology, vol.40, p.888–895, 2007.

KRISTENSEN, J. B. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Substrate interactions and high solids loadings. Forest & Landscape Research No. 42-2008. Forest & Landscape Denmark. Frederiksberg. p.130, 2008.

KUMAR, R. e WYMAN, C. E. Cellulase Adsorption and Relationship to Features of Corn Stover Solids Produced by Leading Pretreatments. Biotechnology and Bioengineering, vol. 103, n°. 2, p.252–267, 2009.

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

LEE, Y. H.; FAN, L. T. Kinetics studies of enzymatic hydrolysis os insoluble cellulose: analysis of the initial rates. Biotechnol. Bioeng., XXIV, 2383-2406, 1982.

LEE, S. B.; SHIN, H. S.; RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Adsorption of cellulose on cellulose: effect of physicochemical properties os cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. Biotechnol. Bioeng., XXIV, p.2137-2153, 1982.

LI, J.; LI, S.; FAN, C.; YAN, Z. The mechanism of poly (ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 89, p. 203-210, 2012.

LOU, H.; WANGA, M.; LAI, H, et al. Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. Bioresource Technology, vol. 146, p. 478–484, 2013.

LU, Y. P.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J. N. Mansfield SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steamexploded softwood residues. Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 98, p.641-654, 2002.

118

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. Annu.Rev. Energy Environ., vol. 21, p.403–465, 1996.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 57–58, p.741–761, 1996.

MANSFIELD, S. D & MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulose in crystalline cellulose degradation. Cellulose, vol. 10, p.159–169, 2003.

MASEL, R. I. **Principles of adsorption and reaction on solid surfaces**. Wiley series en chemical engineering. Chapter 3, p.108, 1951.

MATSUOKA, S. Botânica e Ecofisiologia da cana-de-açúcar. Maringá: UFPR/SENAR, 26p, 1996.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. In: BORÉM, A. (Org.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p.205-251, 1999.

MAURER, S. A.; BEDBROOK, C. N.; RADKE, C. J. Cellulase Adsorption and Reactivity on a Cellulose Surface from Flow Ellipsometry. Industrial and Engineering Chemistry Research. dx.doi.org/10.1021/ie3008538 | vol. 51, p.11389–11400, 2012.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. Unit operations of chemical engineering. 5th ed. McGraw-Hill, Inc. 1993.

McKENDRY P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresour Technol., vol. 83, p. 37e 43, 2002.

McMILLAN, J. D. **Pretreatment of lignocellulosic biomass**. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, p.292–324, 1994.

MEDEIROS, M. B. de. **Metabolismo da celulose em Isoptera**. Revista Biotecnologia Ciências & desenvolvimento – vol. 33, julho/dezembro 2004.

MEDVE, J.; STAHLBERG, J.; TJERNELD, F. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. Appl Biochem Biotechnol., vol. 66, p.39-56, 1997.

MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei:* adsorption, sugar production, and synergism of the enzymes. Biotechnol Bioeng., vol. 59, p.621–34, 1998.

MEDVE, J.; STÅHLBERG, J.; TJERNELD, F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnol Bioeng., vol. 44, p.1064–73, 1994.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, doi:10.1016/j.pecs. 2012

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E., et al. **Preliminary evaluation of organosolv pretreatment of sugar cane bagasse for glucose production**: Application of 23 experimental design. Applied Energy, vol. 87, p.109–114, 2010.

MIIDLA, H. Lignification in plants and methods for its study. Regul. Rosta Pitan. Rast., vol. 87, 1980.

120
MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, vol. 31, n° 3, p. 426-428, 1959.

MIRON, J.; YOSEF, E.; BEN-GHEDALIA, D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. J Agric Food Chem., vol. 49, p. 2322, 2001.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. Effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. Enzyme Microbial Technol., vol. 25, p.644 -50, 1999.

MORENO-CASTILLA, C., Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials, Carbon., vol. 42, p 83, 2004.

MOSIER, N., WYMAN, C.E., DALE, B.D., et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol., vol. 96, p.673–686, 2005b.

MTUI, G. Y. S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. African Journal of Biotechnology, vol. 8, p.1398-1415, 2009.

NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I et al. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. Appl Biochem Biotechnol., vol. 105, p.87-100, 2003.

NEUREITER, M., DANNER, H., THOMASSER, C., SAIDI, B., BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 98–100, p.49–58, 2002.

OJEDA, K.; ÁVILA, O.; SUÁREZ, J.; KAFAROV, V. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production—Part 1. Chem. engineering research and design, vol. 89, p.270–279, 2011.

121

OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Enhancement of enzymatichydrolysis of cellulose by surfactant. Biotechnol Bioeng., vol. 28, p.1727–34, 1986.

OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* of cellulase. Biotechnol. Bioeng., vol. XXV, p. 3103-3114, 1983.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. Philosophical Transactions for the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical SciencesPhilos, vol. 321, p. 523-536, 1987.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. Journal of Biotechnology, vol. p.107, 65–72, 2004.

PAREEK, N.; GILLGREN, T.; JÖNSSON, L. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. Bioresource Technology, vol. 148, p. 70–77, 2013.

PARFITT, G. D.; ROCHESTER, C. H. Adsorption from solution at the solid/liquid interface. Academic press, INC., chapter 1, p.9-11, 1983.

PARK, J. W.; TAKAHATA, Y.; KAJIUCHI, T.; AKEHATA, T. Effects of nonionic surfactant on enzymatic-hydrolysis of used newspaper. Biotechnol Bioeng., vol. 39, p.117–20, 1992.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L.H.; CURVELO, A. A. S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinus taeda wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures. J. Supercrit Fluids, vol. 36, p.31–9, 2005.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization**. 3^a. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.

PENNER, M. H.; LIAW, E. -T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma* cellulase. In: Himmel, M.E., Baker, J.O.,

Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, p.363–371, 1994.

PEREZ, J. A.; GONZALEZ, A.; OLIVA, J. M, et al. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. J Chem Technol Biotechnol., vol. 82, p.929-938, 2007.

PIENKOS, P. T & ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. Cellulose, vol. 16, p.743–762, 2009.

PEITERSEN, N.; MADEIROS, J.; MANDELS, M. Adsorption of *Trichoderma* cellulase on cellulose. Biotechnol. Bioeng., vol. XIX, p.1091-1094, 1977.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H.C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling, vol. 50, p.1-39, 2007.

PRIBOWO, A.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific Trichoderma reesei cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. Enzyme and Microbial Technology, vol. 50, p.195-203, 2012.

QI, B.; CHEN, X.; SU, Y.; WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. Bioresource Technology, vol. 102, p.2881–2889, 2011.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2010.

RABELO, S. C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. **Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept**. Bioresource Technology, vol. 102, p.7887–7895, 2011.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. Enzyme Microbial Technol., vol.15, p.19-25, 1993.

REINIKAINEN, T.; TELEMAN, O.; TEERI, T. T. Effects of pH and high ionic strength on the adsorption and activity of native and mutated cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Proteins Struct. Funct. Genet., vol.22, p.392–403, 1995.

RUTHVEN, D. M. Principles of adsorption and adsorption process. United States of America: Wiley-Interscience Publication, p.1 - 13, 221- 270, 1984.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biochem., vol. 40, p.3693–3700, 2005.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide retreated rice hulls to ethanol. Enzyme Microb Technol., vol. 41, p.528-532, 2007.

SAMANIUK, J. R.; SCOTT, C. T.; ROOT, T. W. e KINGENBERG, D. J. **The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions**. Bioresource Technology, vol. 102, p. 4489–4494, 2011.

SÁNCHEZ, O. J & CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. Bioresource Technology, vol. 99, p.5270–5295, 2008.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of **GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes**. Prog. Bioph. Mol. Biol., vol. 89, p.246-291, 2005.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L., et al. **Potential of sugarcane straw for ethanol production**. Quim. Nova, vol. XY, n. 00, p.1-7, 2011.

SciDAC - Scientific Discovery through Advanced Computing. http://www.scidacreview.org . Acesso em junho de 2012.

SCHURZ, J. Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symp. Proc.; Ghose, T. K.; Ed.; New Delhi, IIT: Delhi, p. 37, 1978.

SEO, D. J.; FUJITA, H.; SAKODA, A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. Adsorption, vol.17, p.813-822, 2011.

SEWALT, V. J. H., GLASSER, W. G., BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation. **3.** Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. J. Agr. Food Chem., vol. 45, p. 1823–1828, 1997.

SILVA, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar**. Trabalho (conclusão de curso) – Apresentado ao Curso de Tecnologia de Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R, et al. A comparision of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresour Technol., vol. 98, p.3000-3011, 2007.

SINITSYN, A. P.; MITKEVICH, O. V.; GUSAKOV, A. V.; KLYOSOV, A. A. Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. Carbohydrate Polym., vol. 10, p.1-14, 1989.

STEINER, W.; SATTLER, W.; ESTERBAUER, H. Adsorption of Trichoderma reesei cellulose on cellulose: experimental data and their different equations. Biotechnol. Bioeng., vol. 32, p.853-865, 1988.

STUTZENBERGER F, LINTZ G. Hydrolysis products inhibit adsorption of *Trichoderma reesei* C30 cellulases to protein-extracted lucerne fibres. Enzyme Microb Technol., vol.8, n°6, p.341-344, 1986.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, vol. 83, p.1–11, 2002.

SHIELDS, S. & BOOPATHY, R. Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cane. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 65, p.142-146 2011.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J. e TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), 1-12, 2005a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C., SLUITER, J. e TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**. *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), 1-8, 2005b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J. e TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), 1-16, 2008.

TOMÁS-PEJÓ, E.; P. ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M, NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes, chapter 7, 2011.

TU, M.; ZHANG, X.; PAICE, M., et al. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. Bioresource Technology, vol. 100, p. 6407-6415, 2009.

VARGAS BETANCUR, G. J.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 13, 2010.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. Bioresource Technol., vol. 36, p.3-14, 1991.

WANG, W.; KANG, L.; WEI, H, et al. Study on the Decreased Sugar Yield in EnzymaticmHydrolysis of Cellulosic Substrate at High Solid Loading. Appl Biochem Biotechnol., vol. 164, p.1139-1149, 2011.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. **Methods for measuring cellulase activities**. pp. 87-116. In: W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), Methods in enzymology, Vol. 160. Academic Press, San Diego, CA, 1988.

WYMAN, C.E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook of Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, DC, USA, ISBN 1-56032-553-4 (Chapter 1), 1996.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T., et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. Bioresource Technology, vol. 96, n°. 18, p.1959-1966, 2005.

WRIGHT, J. D. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. Chem Eng Prog., vol. 84, p.62-74, 1988.

YANG, B.; WYMAN, C. E. **BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates**. Biotechnol. Bioeng., vol. 94, p.611-617, 2006.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P., et al. Applied Biochemistry Biotechnology, vol. 84-86, no. 1-9, p.1147-1161, 2000.

ZHANG Z, et al. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. Biotechnol Adv., doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.020, 2012.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. Biotechnol. Bioeng., vol. 88, p.798-824, 2004.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol., vol. 82, p.815-827, 2009.

ZHENG, Y. **Kinetic modeling of enzymatic saccharification and particleboard characteristics of saline biomass**. Dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of doctor in the University of California, 2007.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. **Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production**. Int J Agric & Biol Eng., vol. 2, p.51-68, 2009.

ZHENG, Y.; ZHANG, S.; MIAOA, S.; SU, Z. e WANG, P. Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. Journal of Biotechnology, vol. 166, p. 135–143, 2013.

ZHU, Z., SATHITSUKSANOH, N., VINZANT, T., et al. Comparative Study of Corn Stover Pretreated by Dilute Acid and Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation: Enzymatic Hydrolysis, Supramolecular Structure, and Substrate Accessibility. Biotechnology and Bioengineering, vol. 103, n°. 4, 2009.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. Bioresour. Technol., vol. 101, p.4992–5002, 2010.

ZHU, J. Y & ZHUANG, X. S. Conceptual net energy output for biofuel production fromlignocellulosic biomass through biorefining. Prog. Energy Combust. Sci., vol. 138, p.583-598,2012.