UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO ENTRE XILANASES E CELULASES NA DESCONSTRUÇÃO DO COMPLEXO LIGNOCELULÓSICO E DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO GERADO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

CLÁUDIA GIANNINI FERREIRA

Orientador: Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2019

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO ENTRE XILANASES E CELULASES NA DESCONSTRUÇÃO DO COMPLEXO LIGNOCELULÓSICO E DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO GERADO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

CLÁUDIA GIANNINI FERREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processo Bioquímicos (*MSc*).

ORIENTADOR

Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2019

CIP - Catalogação na Publicação

G433
383a

Giannini Ferreira, Cláudia
Avaliação do efeito sinérgico entre xilanases e celulases na desconstrução do complexo lignocelulósico e da fermentabilidade do hidrolisado gerado na produção de ácido lático / Cláudia Giannini Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2019.
106 f.

Orientador: Nei Pereira Jr..
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Engenharia de Bioprocessos. 2. Enzimologia. 3. Celulases. 4. Xilanases. 5. Fermentação lática. I. Pereira Jr., Nei, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO ENTRE XILANASES E CELULASES NA DESCONSTRUÇÃO DO COMPLEXO LIGNOCELULÓSICO E DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO GERADO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

CLÁUDIA GIANNINI FERREIRA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*), sob orientação do professor Nei Pereira Jr.

Aprovada em 16/04/2019, por:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)
(Orientador)

Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, *DSc* (EQ/UFRJ)

Drª Danuza Nogueira Moysés, *DSc* (CENPES-PETROBRAS)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2019

Ao meu marido que acreditou em mim em todos os momentos, desde o principio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à meus amigos espirituais, que vem iluminando meu caminho, me proporcionando cada dia mais força e sabedoria na passagem por esse plano.

Agradeço com todo meu coração a meu marido, Edno, por toda paciência, compreensão, companhia, amor, e principalmente por ter acreditado em mim, me permitindo abrir mão um bem momentâneo para progredir e investir em meu, em nosso, futuro. Impossível descrever aqui tudo que você me proporciona, me dando força em todos os momentos que preciso, sempre me colocando para frente, acreditando e apoiando todas minhas decisões. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado você no meu caminho, sou *imensamente feliz* por tê-lo ao meu lado.

Tenho gratidão eterna aos meus pais, Dayse e Edson, que abriram mão de muito, sempre acreditando e dedicando a mim toda confiança. Tenho orgulho de ser sua filha! Tudo que sou hoje é graças a vocês, que sempre acreditaram no meu potencial, mesmo quando eu mesma não o enxergava. Obrigada por tudo.

Não posso deixar passar também companheirismo de minha irmã, Carolina. Nossos momentos de risadas e brincadeiras juntas superam qualquer coisa, assim como todo apoio que me deu neste período. Agradeço a toda minha família: minha dinda Martha, meus tios Edson e Érica, Roberto, Dinah e Wagner, meus sogros Jurema e Edno, cunhados, Ana Paula e Vitor, por todo carinho, palavras de apoio e incentivo sempre. A meus primos Marlo, Edson e Lucca por todos os momentos de brincadeiras, bagunças e torcidas... Vocês todos são demais.

Ao meu querido professor e orientador, Nei Pereira Junior por me receber e aceitar em seu excelentíssimo grupo de estudantes, por toda confiança em mim depositada e todo encorajamento dado. O senhor, sem dúvidas, é uma inspiração para todos nós com seus ensinamentos e histórias maravilhosas a contar. Sou grata por fazer parte da Equipe LADEBIO.

Ao gerente de nosso laboratório, o funcionário Luiz, por toda ajuda e atenção sempre que algo me foi necessário, fora os momentos de descontração no corredor, junto aos amigos de laboratório.

Ah, meus amigos de laboratório... Que prazer foi tê-los junto comigo durante toda essa trajetória. Gostaria de agradecer em especial Anelize, por toda paciência e carinho que teve para me explicar e treinar nas atividades laboratoriais, você foi excepcional e essencial em minha formação. Aos queridos amigos Douglas, Mariana, Carina e Rodrigo por toda ajuda e orientação prestada no caminho, tardes e mais tardes de discussões de resultados... Vocês foram e são maravilhosos e sou imensamente grata a vocês. Aos amigos tão queridos amigos Manuela, Ana Paula, Ana Pantoja, Leonard, Teresa, Adam, Marcos e Angela, porque precisamos também daqueles momentos gostosos de descontração. Amo todos vocês, e reconheço que somos um grupo difícil de encontrar.

Às estagiárias que tiveram contribuição para finalização deste trabalho, Monaliza e Tamiris, sempre muito prestativas e doces, prontas para quaisquer atividades. Melhores estagiárias não hão! Podiam ter chegado há mais tempo, fico muito feliz com o amadurecimento profissional de vocês.

Aos meus queridos amigos e amigas, irmãos de coração, que mesmos com todos meus momentos de ausência, nunca deixaram de me procurar, apoiar e confortar. Amo vocês.

À FAPERJ pela concessão de bolsa de estudos de 12 meses nesse período de pesquisas.

Aos funcionários da secretária de Pós Graduação da Escola de Química, meus sinceros agradecimentos por estarem sempre prontos e dispostos a ajudar e resolver todos os assuntos referentes à minha matrícula, sempre buscando facilitar em toda e qualquer conjuntura.

À coordenação da Pós Graduação da Escola de Química agradeço pelo empenho nos últimos anos em busca de excelência para o programa de Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

"*It must endure the presence of a few caterpillars if the wish is to become acquainted with the butterflies*."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

FERREIRA, Cláudia Giannini. **Avaliação do efeito sinérgico entre xilanases e celulases na desconstrução do complexo lignocelulósico e da fermentabilidade do hidrolisado gerado na produção de ácido lático.** Dissertação de mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – Brasil, 2019.

Orientador: Nei Pereira Junior.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sinergismo entre glucanases e xilanases, a fim de facilitar o acesso de enzimas do complexo celulásico à celulose, que é muitas vezes influenciado pela existência de xilanas repreciptadas na matriz lignocelulósica. Desta forma, um coquetel enzimático otimizado contendo xilanases e glucanases poderia favorecer a conversão da celulose em glicose. Para isso, duas biomassas lignocelulósicas foram inicialmente utilizadas para avaliar o grau de sinergismo entre essas enzimas: uma com origem da indústria de celulose – proveniente do sistema de decantação, denominada polpa celulósica – e a outra foi um bagaço de cana-de-açúcar submetido a um pré-tratamento alcalino (CAPD). Ensaios preliminares realizados com as enzimas celulase e xilanase purificadas da Sigma-Aldrich®, apresentaram como resultado de hidrólise enzimática da CAPD 31% de eficiência hidrolítica (HE) quando hidrolisada apenas com celulase; no entanto, quando um coquetel com as duas enzimas (1:1) foi usado, a HE aumentou para 43%, resultando em um grau de sinergismo (GS) de 25%. Com a polpa celulósica, a HE foi de 30,5% apenas com celulase e 39,8% com ambas as enzimas, fornecendo um GS de 13%. Para confirmar este resultado, outro experimento foi realizado com CAPD, aumentando o TS para 2,5%, atingindo 40% e 55% de HE, apenas com celulase e com o coquetel contendo ambas as enzimas, respectivamente. Foi aplicada, em paralelo, a mesma metodologia para avaliação de sinergismo entre a xilanase purificadas e um extrato produzido *in situ* no LADEBIO a partir do fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*, com os quais foi possível obter eficiência de hidrólise 87% apenas com o preparado LADEBIO e 100% de eficiência quando utilizado o coquetel com as xilanases purificadas e as enzimas produzidas *in situ.* Para alcançar um sistema otimizado tendo como resposta a eficiência hidrolítica e a produção de glicose, utilizou-se a técnica estatística de planejamento experimental *delineamento composto central rotacional* (DCCR). Através do DCCR foi possível chegar a melhor condição do sistema: teor de sólidos de 12,8% (m/v), carga de celulases de 23,4$mg_{proteína}/g_{celulose}$ e carga de xilanases de 6,6$mg_{proteína}/g_{celulose}$, onde se obteve 89% de eficiência hidrolítica e 62g/L de glicose. Desta forma, foi produzido um hidrolisado enzimático nas condições previamente otimizadas, obtendo-se 94% de eficiência de hidrólise e 61,9g/L de glicose. Para avaliação da fermentabilidade deste hidrolisado enzimático na produção de ácido lático, foi realizado experimento de fermentação em biorreator em batelada simples, utilizando a cepa *Lactobacilllus pentosus* ATCC 8041. A produtividade máxima alcançada foi de 1,26 g/(L.h), com produção de 46,8g/L de ácido lático. A eficiência de fermentação do sistema foi de 85,1% do total teórico. O presente estudo conferiu apenas uma análise preliminar da fermentabilidade de um xarope rico em açúcares formado a partir de CAPD hidrolisada com preparado enzimático LADEBIO.

Palavras-chave: Sinergismo, Celulases, Xilanases, produção de enzimas, Hidrolisado enzimático, Fermentação, *Lactobacillus pentosus*, Ácido Lático.

ABSTRACT

FERREIRA, Cláudia Giannini. **Evaluation of the synergistic effect between xylanases and cellulases in the deconstruction of the lignocellulosic complex and the fermentability of the hydrolyzate generated in the production of lactic acid.** Master's Dissertation, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – Brazil, 2019.

Advisor: Nei Pereira Junior.

This study proposes to evaluate the synergism between glucanases and xylanases, in order to facilitate the access of cellulolytic enzymes to cellulose, which is influenced through the existence of reprecipitated xylan in the lignocellulosic matrix. Therefore, the design of an optimal cocktail containing xylanases and glucanases could increase the conversion of cellulose to glucose in a cellulolytic complex. For this, two lignocellulosic biomasses were initially used to evaluate synergism between these enzymes. One of them is a pulp mill origin from cellulose industry - coming from the decanting system; the other was sugarcane bagasse subjected to an alkaline pre-treatment (CAPD). A preliminary assay was performed using as enzymes cellulase and xylanase from Sigma-Aldrich®. Hydrolysis of CAPD resulted in 31% hydrolytic efficiency (HE) when hydrolyzed only with cellulase; however, when a cocktail with two enzymes (1:1) was used, HE increased to 43%, resulting in a synergism (SD) of 25%. With cellulose pulp, HE was only 30.5% with cellulase and 40% with both enzymes, giving a GS of 13%. To confirm this result, another experiment was performed with CAPD, increasing SL to 2.5%, reaching 40% and 55% HE, with cellulase alone and with the cocktail containing both enzymes, respectively. In parallel, the same methodology was used to evaluate synergism between the purified xylanases and an extract produced *in situ* in LADEBIO, from the filamentous fungus *Penicillium funiculosum*, where it was possible to obtain 87% hydrolysis efficiency only with the preparation LADEBIO and 100% efficiency when using the cocktail with the purified xylanases and enzymes produced *in situ*. In order to reach an optimized system focus into hydrolytic efficiency and glucose production, it was used the statistical technique of experimental design of the central rotational compound design (DCCR). Using DCCR, it was possible to reach the betters conditions: solids content of 12.8% (m/v), cellulase loading of 23.4$mg_{protein}/g_{cellulose}$ and xylanase loading of 6.6$mg_{protein}/g_{cellulose}$, whereby 89% of hydrolytic efficiency and 62g/L of glucose production. Thus, a enzymatic hydrolyzate was produced under the conditions previously optimized, reaching 94% of hydrolysis efficiency and 69,1g/L of glucose production. A batch fermentation bioreactor with *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 was evaluated for its fermentability and efficiency production of lactic acid. The maximum productivity reached was 1.26 g/(L.h), with yield of 46.8 g/L of lactic acid. The fermentation efficiency of the system was 85.1% of the total theoretical. The present study shows a preliminary analysis of the fermentable of a sugar rich hydrolyzate formed from CAPD hydrolyzed with enzyme preparate LADEBIO.

Keywords: Synergism, Cellulases, Xylanases, Enzyme Production, Enzymatic Hydrolyzate, Fermentation, *Lactobacillus pentosus*, Lactic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Compilação de dados percentuais da matriz energética mundial e brasileira 22

Figura 2.2 Analogia conceitual entre refinaria de petróleo e biorrefinaria 24

Figura 2.3 Principais matérias-primas glicídicas, substratos e produtos correspondentes 26

Figura 2.4 Estrutura da biomassa lignocelulósica 28

Figura 2.5 Estrutura da fração celulósica de materiais lignocelulósicos. As ligações de hidrogênio numeradas de 1 a 3 são ditas como ligações de hidrogênio intramoleculares; as identificadas de 4 a 7 são classificadas como ligações intermoleculares 29

Figura 2.6 Fórmulas estruturais das principais unidades de monossacarídeos de hemicelulose. Estruturas químicas de compostos hemicelulósicos, (a) xilana e (b) glucomanana 31

Figura 2.7 Precursores primários da lignina 33

Figura 2.8 Etapas de produção da pasta de celulose; funcionamento de uma indústria de celulose e papel 35

Figura 2.9 Esquema da microfibra de material lignocelulósico submetida a um processo de pré-tratamento. O processo rompe as ligações de hidrogênio e interações glicosídicas para aumentar a acessibilidade às frações C5 e C6 da matriz celulósica 39

Figura 2.10 Exemplo das etapas de hidrólise enzimática catalisada por uma exoglucanase com módulo de ligação ao carboidrato (CBM) 44

Figura 2.11 Estrutura química da hemicelulose e as enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de degradação do polímero 48

Figura 2.12 Esquema da hidrólise enzimática da celulose 51

Figura 2.13 Esquema de remoção da xilana reprecipitada. **(A)** matriz lignocelulósica pré-tratada alcalinamente (perde-se grande parte da lignina e há formação de xilana reprecipitada). **(B)** Hemicelulases capazes de degradar os açúcares reprecipitados, facilitando o acesso as celulases às fibras de celulose 53

Figura 2.14 Utilização do ácido lático como bloco de construção na indústria química 55

Figura 2.15 Fórmula estrutural dos isômeros quirais de ácido lático 56

Figura 2.16 Rotas metabólicas simplificadas da fermentação das baterias ácido láticas, fermentação homofermentativa de glicose; fermentação heterofermentativa de glicose e pentoses 58

Figura 4.1 Bagaço de cana-de-açúcar, antes e após o pré-tratamento alcalino proposto e maceração em moinho 63

Figura 4.2 Polpa celulósica após sair do processo de decantação (à esquerda), e após processamento em moinho microfino (à direita) 63

Figura 4.3 Esquema simplificado da análise quantitativa de atividade enzimática de FPase 68

Figura 4.4.(a) Esquema simplificado (fase inicial) da análise das atividades enzimáticas avicelásica, CMCásica e xilanásica 69

Figura 4.4.(b) Continuação Figura 4.4(a). Esquema simplificado (fase final) da análise das atividades enzimáticas avicelásica, CMCásica e xilanásica 70

Figura 4.5 Biorreator para a fermentação lática a partir da CAPD hidrolisada, inoculado com *L. pentosus* em operação por batelada simples 79

Figura 5.1 Diagrama de Pareto gerado para variável de resposta **eficiência de hidrólise** 88

Figura 5.2 Diagrama de Pareto gerado para variável de resposta **produção de glicose** 89

Figura 5.3 Gráficos de otimização de proporções das variáveis independentes estudadas no DCCR 89

Figura 5.4 Produção de açúcares no processo de hidrólise enzimática e percentual da eficiência hidrolítica em produção de glicose. O sistema ótimo obtido no planejamento foi aplicado, desta forma o teor de sólidos foi de 12,8% (m/v), carga de celulases de 23,4$mg_{proteína}/g_{celulose}$ e carga de xilanases de 6,6$mg_{proteína}/g_{celulose}$ 91

Figura 5.5 Cinética de fermentação de ácido lático produzido a partir do hidrolisado de CAPD por L. pentosus ATCC 8041 em biorreator de batelada simples, com pH 6,5 em anaerobiose a 37ºC e 150rpm 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Série histórica de geração de matérias-primas glicídicas no Brasil 26

Tabela 2.2 Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração 28

Tabela 2.3 Série histórica da produção de cana-de-açúcar e seus resíduos em território nacional 38

Tabela 4.1 Componentes do reagente DNS 66

Tabela 4.2 Variáveis independentes, seus níveis e valores reais 76

Tabela 4.3 Matriz do planejamento experimental 76

Tabela 4.4 Componentes meio líquido de cultivo MRS 78

Tabela 5.1 Composição bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento alcalino e polpa celulósica 80

Tabela 5.2 Quantificação das principais atividades enzimáticas e concentração de proteínas referente a todas quatro enzimas utilizadas no âmbito desta dissertação 81

Tabela 5.3 Hidrólise enzimática para escolha da biomassa e estudo de sinergismo. Ensaio realizado utilizando teor de sólidos de 1,0% e cargas enzimáticas de $10mg_{proteína}$ /$g_{celulose}$, por 24h, a 50ºC em 200rpm 82

Tabela 5.4 Experimentos de hidrólise realizados para estudo sinérgico entre polls enzimáticos. Os ensaios realizados com Celulase da Sigma® e o extrato LADEBIO foram realizados com teor de sólidos de 2,5% e carga de proteínas de 10mgproteína /gcelulose enquanto os ensaios envolvendo o pool enzimático da Celic C-Tec2 foi realizado com teor de sólido de 20% e carga de proteínas de 20mgproteína /gcelulose, todos os ensaios foram realizados a 50ºC, por 24h em 200rpm 83

Tabela 5.5 Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis de resposta. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®, com triplicata do ponto central (C) para a otimização de sistema de produção de hidrolisado fermentável altamente concentrado 85

Tabela 5.6 Matriz Tabela ANOVA do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta Eficiência Hidrolítica. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma® 86

Tabela 5.7 Tabela ANOVA do DCC realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta Produção de Glicose. Planejamento

experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma® 86

Tabela 5.8 Tabela de efeitos estimados do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta Eficiência de Hidrólise. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma® 87

Tabela 5.9 Tabela de efeitos estimados do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta Produção de Glicose. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma® 88

Tabela 5.10 Valores preditos calculados pelo *software* STATISTICA e valores obtidos em experimentos de validação do planejamento 90

Tabela 5.11 Respostas obtidas na produção de ácido lático encontradas na literatura 94

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 Algumas das principais enzimas degradadoras do material 45

Quadro 2.2 Classificação das celulases de acordo com a IUBMB: códigos Enzyme Comission (E.C.), nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas 46

Quadro 2.3 Enzimas xilanásicas acessórias e suas respectivas reações hidrolíticas 49

Quadro 2.4 Principais formas de sinergismo entre enzimas do complexo celulolítico 51

Quadro 2.5 Características principais das rotas metabólicas para bactérias ácido-láticas 58

Sumário

Capítulo 1 – APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO 18
Capítulo 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1 MATRIZES ENERGÉTICAS 21
2.2 BIORREFINARIA 23
2.3 MATÉRIAS-PRIMAS – BIOMASSAS 25
2.3.1 Matérias-primas Glicídicas - Materiais Lignocelulósicos 25
2.3.2 Polpa Celulósica 34
2.3.3 Bagaço da Cana-de-açúcar 36
2.4 PRÉ-TRATAMENTOS PARA MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 38
2.4.1 Pré-tratamento Alcalino 41
2.5 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 42
2.5.1 Hidrólise Enzimática 42
2.6 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS 45
2.6.1 Celulases 45
2.6.2 Hemicelulases 47
2.7 SINERGISMO 49
2.7.1 Sinergia do Complexo Celulásico 50
2.7.2 Sinergia do Complexo Hemicelulásico 52
2.7.3 Sinergia entre celulases e hemicelulases 52
2.8 ÁCIDOS ORGÂNICOS 54
2.9 ÁCIDO LÁCTICO 54
2.9.1 Aplicações do ácido lático 54
2.9.2 Rotas tecnológicas de produção de ácido lático 55
2.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS 59
Capítulo 3 – JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS 60
3.1 OBJETIVOS GERAIS 61
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 61
Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS 62
4.1 PRÉ-TRATAMENTO DAS BIOMASSAS 62
4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar 62
4.1.2 Polpa celulósica 63
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS 64
4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS 65

4.3.1 Preparo reagente DNS e tampão citrato de sódio 66
4.3.2 Quantificação da atividade enzimática em papel de filtro (FPásica) 67
4.3.3 Quantificação da atividade enzimática avicelásica 69
4.3.4 Quantificação da atividade enzimática CMCásica 70
4.3.5 Quantificação da atividade β-glucosidásica 71
4.3.6 Quantificação da atividade endo-xilanásica 72
4.3.7 Quantificação da concentração de proteínas pelo método de *Bradford* 73
4.3.8 Quantificações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 73
4.3.9 Cálculo de Eficiência de Hidrólise 73
4.3.10 Cálculo para estudo do efeito sinérgico da adição de xilanases aos meios reacionais 74
4.4 ESCOLHA DE BIOMASSA E ANÁLISE DE SINERGISMO ENTRE CELULASES E XILANASES 74
4.5 ENSAIOS DE PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO UTILIZANDO DIFERENTES COQUETÉIS PARA HIDRÓLISE 75
4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA REACIONAL 76
4.7 PRODUÇÃO DE HIDROLISADO CONCENTRADO E CURVA CINÉTICA DE EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA 77
4.8 FERMENTAÇÃO LÁTICA DO HIDROLISADO PRODUZIDO 78
Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES 80
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS 80
5.2 ATIVIDADES DAS ENZIMAS ESTUDADAS 81
5.3 ESCOLHA DA BIOMASSA E ESTUDO DE SINÉRGICO ENTRE CELULASES E XILANASES 82
5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA REACIONAL 84
5.5 PRODUÇÃO DE HIDROLISADO CONCENTRADO E CURVA CINÉTICA DE EFICIÊNCIA 90
5.6 PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO OBTIDO 92
Capítulo 6 – CONCLUSÕES 96
Capítulo 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 99
REFERÊNCIAS 100

Capítulo 1 – APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO

A conjuntura mundial de crescimento populacional associada a um aumento das atividades de indústrias vem consequentemente ampliando a necessidade por combustíveis, energia e insumos, bem como a gradativa preocupação da dependência por fontes não renováveis. Tais fontes além de apresentarem distribuição desigual, mostram entraves em seu uso, uma vez que são os principais emissores de gases causadores do efeito estufa e poluição atmosférica. Desta forma, alternativas energéticas que têm como base fontes renováveis, sustentáveis e ecologicamente corretas são importantes recursos para reverter o quadro anteriormente citado.

Para a geração de produtos sustentáveis uma grande diversidade de matérias-primas pode ser utilizada como fonte de carbono e nutrientes. As matérias-primas para tais bioprocessos podem ser agrupadas em função da estrutura e complexidade molecular dos substratos pelos quais os produtos são obtidos. Em alguns casos, os substratos estão disponíveis em forma polimérica, sendo necessária uma hidrólise prévia, caso o agente biológico disponível no meio não seja capaz de sintetizar enzimas que catalisem a despolimerização desses substratos (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Materiais ricos em açúcares e derivados incluem fontes sacaríneas e amiláceas e também as fontes lignocelulósicas, que se destacam por seu caráter residual, como o bagaço de cana-de-açúcar. Estes materiais são caracterizados como resíduos agrícolas, ou seja,

resíduos gerados direta ou indiretamente no processo de produção da atividade agrícola. O processo de degradação do material lignocelulósico por rota bioquímica apresenta quatro etapas principais: pré-tratamento do material; hidrólise enzimática dos açúcares; fermentação do hidrolisado enzimático obtido e separação do produto final (Dimarogona *et al.*, 2013).

Estudos relacionados à otimização das etapas supracitadas vem sendo conduzidos com o objetivo de viabilizar a produção em larga escala de bioprodutos de base lignocelulósica. O custo e a eficiência de hidrólise enzimática utilizada para degradação da biomassa são alguns dos fatores limitantes do processo, e formam consideráveis gargalos tecnológicos e econômicos (Alvira *et al.*, 2011). O Brasil depende de empresas estrangeiras para a produção enzimas em geral. Entretanto, é sabido que o conceito de engenharia de produto pode ser aplicado no processo de produção de celulases e outras proteínas acessórias a partir de microrganismos capazes de expressar tais genes produtores ou ainda pela incorporação controlada em microrganismos hospedeiros, a fim que a célula mutante secrete as enzimas desejadas nas proporções ideais (Wen *et al*, 1995 *apud* Maeda, 2010).

No Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), Castro (2006) avaliou as principais linhagens produtoras de celulases, estudando propriedades cinéticas, fisico-químicas e catalíticas; Maeda (2010) estudou a produção de celulases por *Penicillium funiculosum* ATCC 11797; Dias (2011) desenvolveu uma pesquisa para produção de β-glucosidases a partir de *Aspergillus* ATCC 1004; Rocha (2014) estudou a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844; Jaramillo (2014) avaliou também a produção de ácido lático de segunda geração a partir de diferentes linhagens de *Lactobacillis*; Mendez (2016) desenvolveu um biocatalisador celulolítico balanceado, a partir de enzimas de *A. niger, P. funiculosum* e *T. harzianum*, bem como promoveu estudos com proteínas acessórias para a eficiente conversão de biomassa em açúcares fermentáveis, para posterior fermentação e produção de etanol; Passos (2018) otimizou o cultivo de *P. funiculosum* para a produção de hidrolases visando a sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica. Todos estes trabalhos empregaram bagaço de cana pré-tratado como fonte carbono para a produção enzimática.

Isto posto, o presente trabalho buscou o estudo do efeito sinérgico entre celulases comerciais purificadas e xilanases comerciais purificadas, bem como a sinergia entre as xilanases purificadas e um preparado enzimático produzido *in situ* no LADEBIO a partir do fungo *P. funiculosum* (Passos, 2018) e xilanases purificadas com coquetel enzimático Celic

C-Tec 2. A segunda etapa do trabalho visou a fermentação lática do hidrolisado produzido em condições ótimas entre o preparado enzimático LADEBIO e as xilanases purificadas.

A presente dissertação de mestrado está estruturada da seguinte forma: inicia-se com o referencial teórico e o estado da arte de matrizes energéticas seguida de uma breve alusão a biorrefinarias e matérias primas-glicídicas, ressaltando seus principais constituintes moleculares, e pré-tratamentos utilizados para matéria-prima lignocelulósica. Após, conceitua-se hidrólise enzimática e as enzimas lignocelulolíticas do grupo das celulases e hemicelulases, quando então é realizado um aprofundamento no que diz respeito ao sinergismo entre esses dois grupos. Este capítulo foi finalizado com uma breve explanação sobre ácidos orgânicos, dando ênfase ao ácido lático, produto final obtido neste trabalho.

No capítulo 3, são apresentadas as justificativas e os objetivos propostos para a pesquisa. Em seguida, no capítulo 4, estão descritas de forma detalhada as metodologias e análises utilizadas para a execução do presente trabalho. Os resultados apresentam-se na sequência, e são discutidos com base em todo conteúdo adquirido, bem como comparados, quando possível, com resultados obtidos na literatura. Finalmente, relatam-se as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATRIZES ENERGÉTICAS

Em consequência do acentuado crescimento populacional e do aumento das atividades industriais, as perturbações ambientais estão cada vez mais graves e frequentes. A ação antrópica atinge, hoje, grandes dimensões que são facilmente observadas através de alterações na qualidade do solo, do ar e da água. A utilização excessiva da energia fóssil disponível na Terra é um grande obstáculo atual. Fontes alternativas de energia baseadas em processos sustentáveis, regenerativos e ecologicamente corretos são importantes recursos para enfrentar este desafio.

Atualmente, grande parte da matriz energética mundial é derivada de combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão mineral, apresentando em um panorama geral em torno de 87% de exploração desses recursos (IEA, 2019). Todavia, o Brasil se destaca por ser o país que apresenta a energia mais limpa no mundo por possui tecnologias de aproveitamento consolidadas e apresenta um percentual de 43% de utilização das fontes naturais renováveis, como pode ser observado na Figura 2.1 (BEN, 2018).

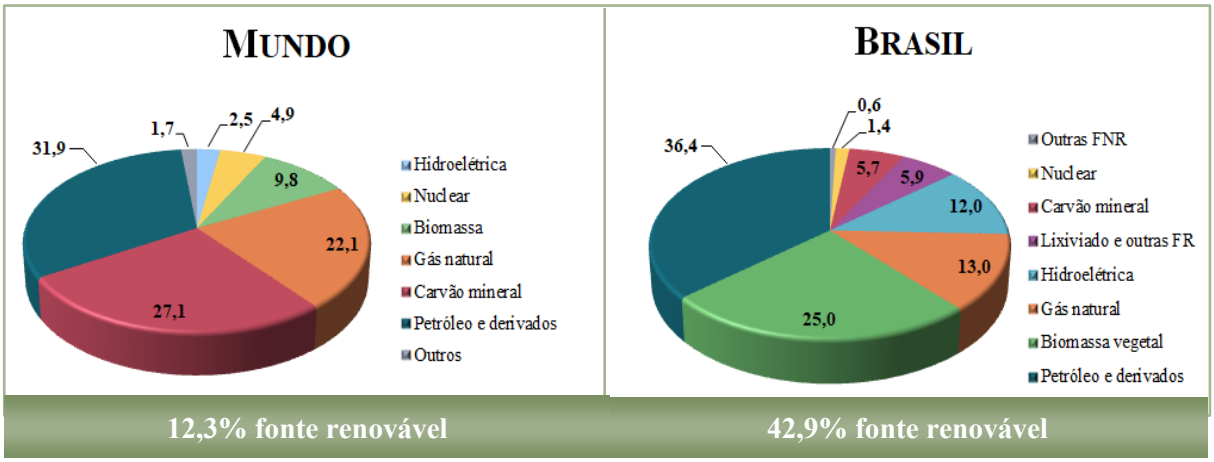


Figura 2.1 Compilação de dados percentuais da matriz energética mundial (IEA, 2019) e brasileira (BEN, 2018)

A retirada de petróleo do subsolo, bem como seu transporte e todos os processos industriais envolvidos em sua transformação em produtos de interesse, podem ser responsáveis por impactos, como derramamentos de óleo, geração de resíduos e efluentes tóxicos de baixa degradabilidade e/ou contaminação dos lençóis freáticos (Bon e Pereira Jr., 1999). De fato, quaisquer atividades industriais que tenham por base matérias-primas fósseis não devem ser consideradas ecologicamente amigáveis, uma vez que não são autossustentáveis, e apesar de serem fontes naturais, não são renováveis e seus produtos são predominantemente não biodegradáveis e ocasionam o acúmulo de diversos poluentes no ambiente.

Bon e Pereira Jr. (1999) destacam que a queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, o que consequentemente intensifica o efeito estufa – fenômeno natural de aquecimento terrestre onde há retenção de calor irradiado pelo Sol à superfície da Terra, e tem por objetivo manter a temperatura média do planeta. Pelo fato de os gases emitidos na utilização destes combustíveis serem muito densos, os mesmos permanecem acumulados na atmosfera em proporções elevadas e formam barreiras que impedem a dissipação do calor gerado pelo Sol, o que ocasiona o aquecimento excessivo da superfície terrestre.

Além disso, há de se considerar o aumento e volatilidade do preço do barril de petróleo que varia conforme os movimentos de oferta e demanda, bem como a fenômenos geopolíticos nas áreas produtoras e nas vias de distribuição. Na intenção de reduzir a necessidade por esta *commodity*, setores de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) investem cada vez mais em produções de larga escala de combustíveis alternativos a partir de recursos renováveis. No ano de 2007, o parlamento americano aprovou uma emenda

legislativa sobre o "*Renewable Fuel Standard*", onde o Departamento de Energia dos EUA traçou a meta crescente para produção de 136 bilhões de litros de biocombustíveis a serem demandados até o ano de 2022 (Figueira, 2015).

2.2 BIORREFINARIA

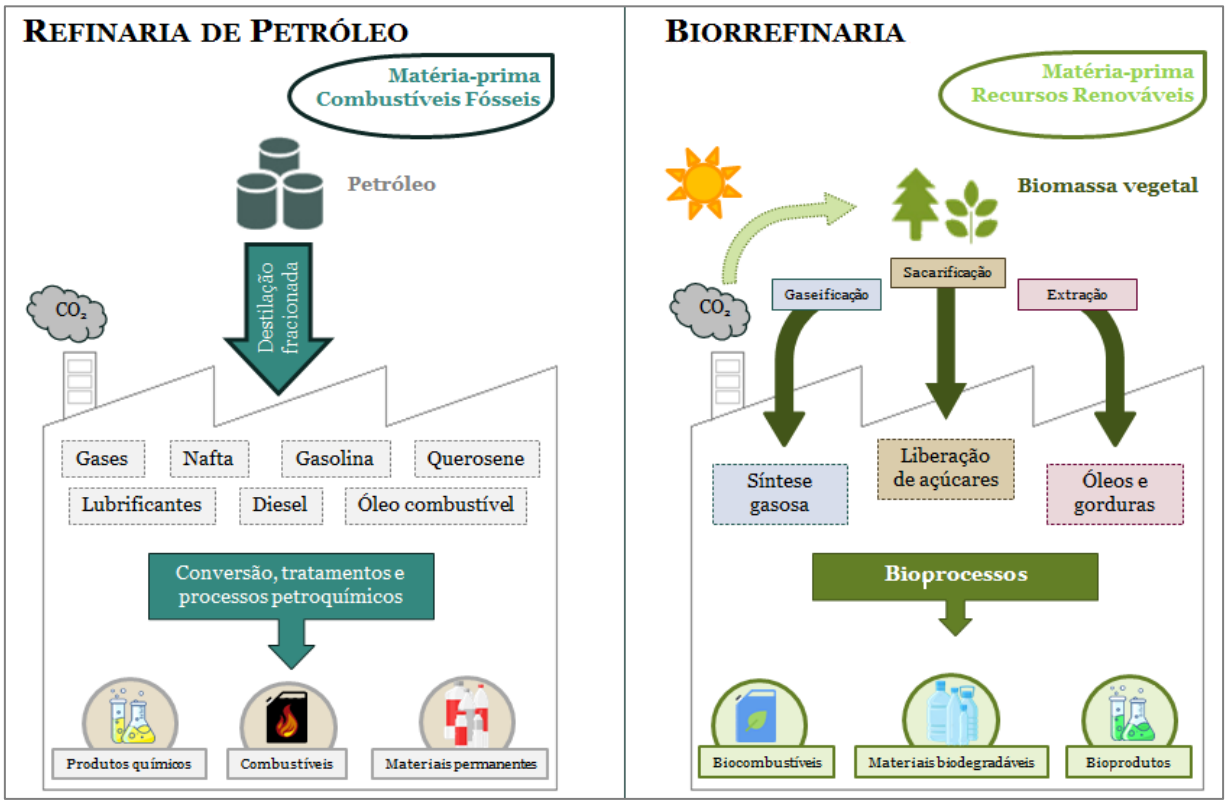
A biorrefinaria surge como uma unidade industrial desenvolvida com o propósito de integrar todos os processos necessários para transformar matéria-prima renovável, biomassas em geral, em bioprodutos de maior valor agregado (Pereira Jr. *et. al*, 2008). A comunidade científica volta sua atenção para esse cenário, dado o elevado interesse nas moléculas presentes na matriz celular das biomassas lignocelulósicas, bem como a utilização de matérias-primas na forma de resíduos.

Sandun *et al.* (2006) mostra que essas unidades industriais têm como objetivo a geração simultânea de produtos *high value/low volume* (HVLV) e *low value/high volume* (LVHV). Para isso, devem ser arquitetadas buscando diversificar o uso da biomassa e reduzir a geração de resíduos, posto que produtos de alto valor agregado aumentam a lucratividade do projeto e produtos de baixo valor agregado contribuem para a demanda energética, reduzindo o custo médio de operação fazendo uso de processos integrados.

As concepções de Biorrefinaria e Química Verde são diretamente relacionadas ao uso de recursos renováveis, de forma que os mesmos obtenham cadeias de valor agregado próximas às atingidas pelos derivados de fontes fósseis. Como mostra a Figura 2.2, o conceito é análogo ao de refinarias de petróleo, ao ponto que ambas tem por objetivo separar e transformar a matéria-prima em diferentes frações que atendam a determinados setores da indústria. Entretanto, em 2010, Vaz Jr. *et al* afirmou que as biorrefinarias ganharam destaque principalmente por atuarem dentro do conceito da bioeconomia e causarem menor impacto ambiental, empregando biomassa como matéria-prima na intenção de valorizar sistemas integrados sustentáveis (tecnologia, processos, resíduos sustentáveis, produtos biodegradáveis), como exposto no paragrafo anterior.

O bioetanol de primeira geração, obtido a partir do caldo de cana-de-açúcar, é um potencial biocombustível capaz de atender à crescente demanda mundial por energia renovável de valor econômico reduzido e baixo poder poluente. Giannini (1997) elucida que as emissões gasosas provenientes da queima do etanol são utilizadas no processo de fotossíntese no desenvolvimento de novos vegetais cultivados. Esse ciclo de emissão-

absorção de CO_2 favorece a disseminação do gás carbônico na atmosfera, indicando o etanol como produto menos prejudicial ao ambiente quando comparado à gasolina, por exemplo.



Fonte: Adaptado de VIASPACE (2018).

Figura 2.2. Analogia conceitual entre refinaria de petróleo e biorrefinaria

Em pesquisa realizada pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (US DOE), foi apresentada uma lista de moléculas ambientalmente significativas produzidas a partir de biomassas. O ácido lático está nessa listagem, destacando-se por ser um importante ácido orgânico para indústria química por sua grande aplicabilidade em diversos setores, como na indústria de cosméticos, de alimentos, farmacêutica, polímeros, têxtil, agroquímica, entre outras (Werpy e Petersen, 2004).

Wee *et al.* (2006) afirmam que o ramo industrial que apresenta maior crescimento na produção e consumo de ácido lático é o setor de polímeros, principalmente pela utilização do mesmo como monômero na produção do polilactato (PLA). O PLA, bioplástico obtido pela polimerização do ácido lático, demonstra características comparáveis aos termoplásticos sintéticos, porém com a vantagem de ser obtido a partir de fontes renováveis. Outras singularidades que devem ser evidenciadas também se devem ao fato de ser um composto biodegradável, compostável e reciclável.

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS – BIOMASSAS

Denomina-se biomassa toda matéria orgânica renovável de origem vegetal ou animal, gerada direta ou indiretamente do processo de fotossíntese, a qual dispõe de energia que pode ser processada na intenção de fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final (Pereira Jr. *et. al*, 2008). Os resíduos agroindustriais, obtidos a partir de culturas agrícolas, apresentam alto valor energético e são capazes de reduzir a dependência por energia comprada em suas unidades industriais (Nogueira e Lora, 2003).

O crescimento gradativo de investimentos em PD&I para diferentes tecnologias de produção de substâncias químicas, combustíveis e energia é essencial, principalmente no que diz respeito a biomassa residual de composição lignocelulósica, uma vez que são gerados em grande quantidade em todo o mundo, bem como resíduos celulósicos provenientes da indústria de papel e celulose, gerados na produção da pasta de celulose (Pereira Jr. *et. al*, 2008).

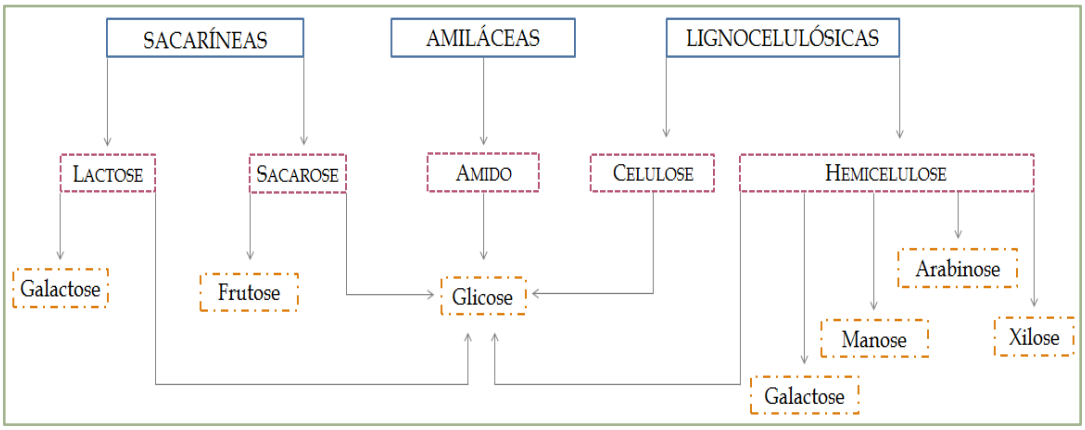
2.3.1 Matérias-primas Glicídicas - Materiais Lignocelulósicos

Para a geração de combustíveis sustentáveis e/ou bioprodutos uma grande diversidade de matérias-primas, em geral oriundas da agroindústria, é utilizada como fonte de carbono e nutrientes. De modo geral, as matérias-primas para tais bioprocessos podem ser agrupadas em função da estrutura e da complexidade molecular dos substratos pelos quais os produtos são obtidos (Figura 2.3). Em alguns casos, os substratos estão disponíveis em forma polimérica, sendo necessária uma hidrólise química prévia, por exemplo, caso o agente biológico disponível no meio não seja capaz de sintetizar enzimas que catalisem a despolimerização desses substratos (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

A utilização de alimentos para produção de biocombustíveis é amplamente discutido em diversos países, posto que algumas das principais questões mundiais é a escassez de alimentos e a preocupação em sanar a desnutrição de grande parte da população mundial. Grupos ambientalistas discutem também a utilização destas biomassas vegetais, uma vez que para o amplo plantio das mesmas por vezes pode aumentar a área de extensão de desmatamento.

Contudo, como exposto na Figura 2.3, materiais ricos em açúcares e derivados incluem não somente fontes sacaríneas e amiláceas, como o caldo da cana-de-açúcar e

diversos grãos, como milho e arroz; mas também as fontes lignocelulósicas, que se destacam por seu caráter residual, como o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, palha de arroz. Estes materiais são caracterizados como resíduos agrícolas, ou seja, resíduos gerados direta ou indiretamente no processo de produção da atividade agrícola, e não competem com os alimentos. Além disto, apresenta menor valor agregado, o que reflete em um custo de produção reduzido se comparado aos combustíveis gerados através das outras fontes de biomassas.



Fonte: Adaptado de Pereira Jr *et al.*, 2008.

Figura 2.3 Principais matérias-primas glicídicas, seus substratos e produtos correspondentes

No Brasil, a biomassa lignocelulósica que mais se destaca, por ter a maior produção anual quando comparada às demais, é o bagaço de cana-de-açúcar. Isso porque o aumento da demanda mundial por fontes de energias renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornaram o país um importante provedor para a exportação desse material. A Tabela 2.1 apresenta séries históricas de produção de matérias-primas glicídicas nos últimos nove anos no Brasil, com suas massas representadas em base úmida. Segundo CONAB (2018), a produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2018/19, é de 615,84 milhões de toneladas, o que representa uma redução de 2,8% em relação à safra anterior.

Tabela 2.1. Série histórica de geração de matérias-primas glicídicas no Brasil

Ano Agrícola	Cana-de-açúcar (milhões t)	Milho (milhões t)	Trigo (milhões t)	Sorgo (milhões t)
2010/11	623,91	57,41	5,79	2,31
2011/12	560,95	72,98	4,38	2,22
2012/13	588,92	81,51	5,53	2,10
2013/14	658,82	80,05	5,97	1,89

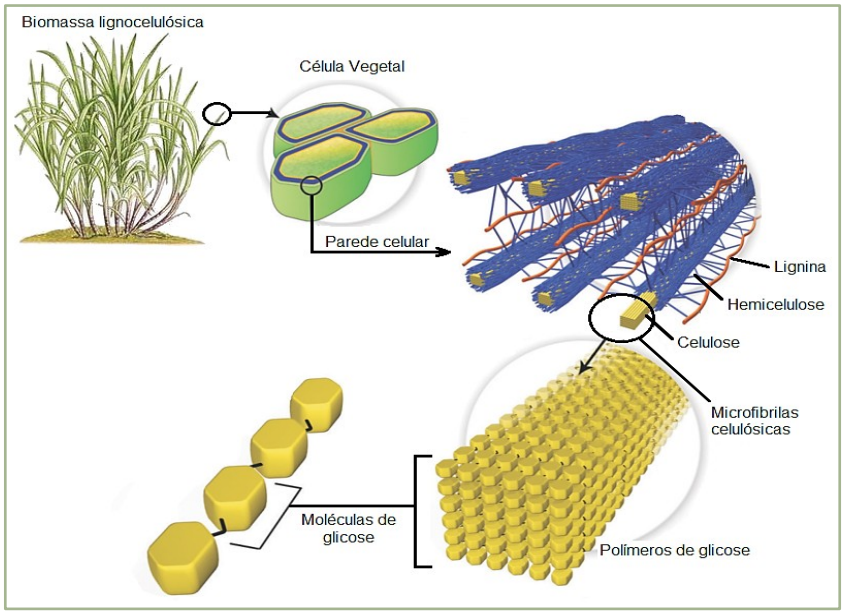
Ano Agrícola	Cana-de-açúcar (milhões t)	Milho (milhões t)	Trigo (milhões t)	Sorgo (milhões t)
2014/15	634,77	84,67	5,53	2,05
2015/16	665,59	66,53	6,73	1,03
2016/17	657,18	97,84	4,26	1,86
2017/18	633,26	80,71	5,43	2,14
2018/19	615,84	91,65	5,63	1,95

Fonte: CONAB, 2018.

Pereira Jr. *et al.* (2008) destacam que as biomassas lignocelulósicas são os compostos orgânicos encontrados em maior abundância no planeta, e ocupam aproximadamente metade do bioma terrestre. O termo lignocelulose é relacionado a uma fração da estrutura que compõe as células vegetais: a parede celular. Segundo Junqueira e Carneiro (2012) essa estrutura apresenta diversas funções, como a de impedir a mobilidade das células, participar da aderência e interação intercelular, influir no crescimento, nutrição, reprodução e defesa celular. Por ser rígida e forte, também garante a sustentação, agindo como esqueleto da planta.

A parede celular apresenta ainda, grande importância econômica, uma vez que está presente nos vegetais inseridos nos grupos das gimnospermas e angiospermas, que são de fundamental relevância quando se tratam de matéria-prima renovável tanto como fonte de alimento, madeira, fibras têxteis e matéria-prima de outros produtos, como papéis, colas, aditivos alimentares, entre outros (Junqueira e Carneiro, 2012). Constitui ainda uma valiosa fonte de matéria-prima para obtenção de bioprodutos como etanol, butanol, ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido propiônico, entre outros (Pereira Jr. *et al*, 2008).

Segundo Castro e Pereira Jr. (2010), estas estruturas são formadas, principalmente, por três frações poliméricas unidas entre si por ligações covalentes: celulose, lignina e hemicelulose (Figura 2.4). Os autores salientam que estruturalmente as fibrilas da fração celulósica, homopolissacarídeo composto por glicose, são dispostas como espirais e encontram-se envolvidas pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis. A fração hemicelulósica é a responsável pelo elo químico entre as duas frações anteriores, por apresentar natureza heteropolissacarídica.



Adaptado de Santos, 2012.

Figura 2.4 Estrutura da biomassa lignocelulósica

Santos (2012) atribuiu a resistência na conversão da biomassa lignocelulósica em insumos bioquímicos, às características bioquímicas e morfológicas do vegetal. A composição química da biomassa lignocelulósica, em geral, apresenta 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e 0-10% de cinzas e extrativos. Esta composição varia em função do gênero e/ou espécie da biomassa em questão. A Tabela 2.2 sinaliza alguns exemplos.

Tabela 2.2 Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração

BIOMASSA LIGNOCELÓSICA	% CELULOSE	% HEMICELULOSE	% LIGNINA
Palha de cana-de-açúcar	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana-de-açúcar	32-48	19-24	23-32
Espiga de milho	45	35	15
Palha de trigo	30	50	15

Fonte: Santos (2012).

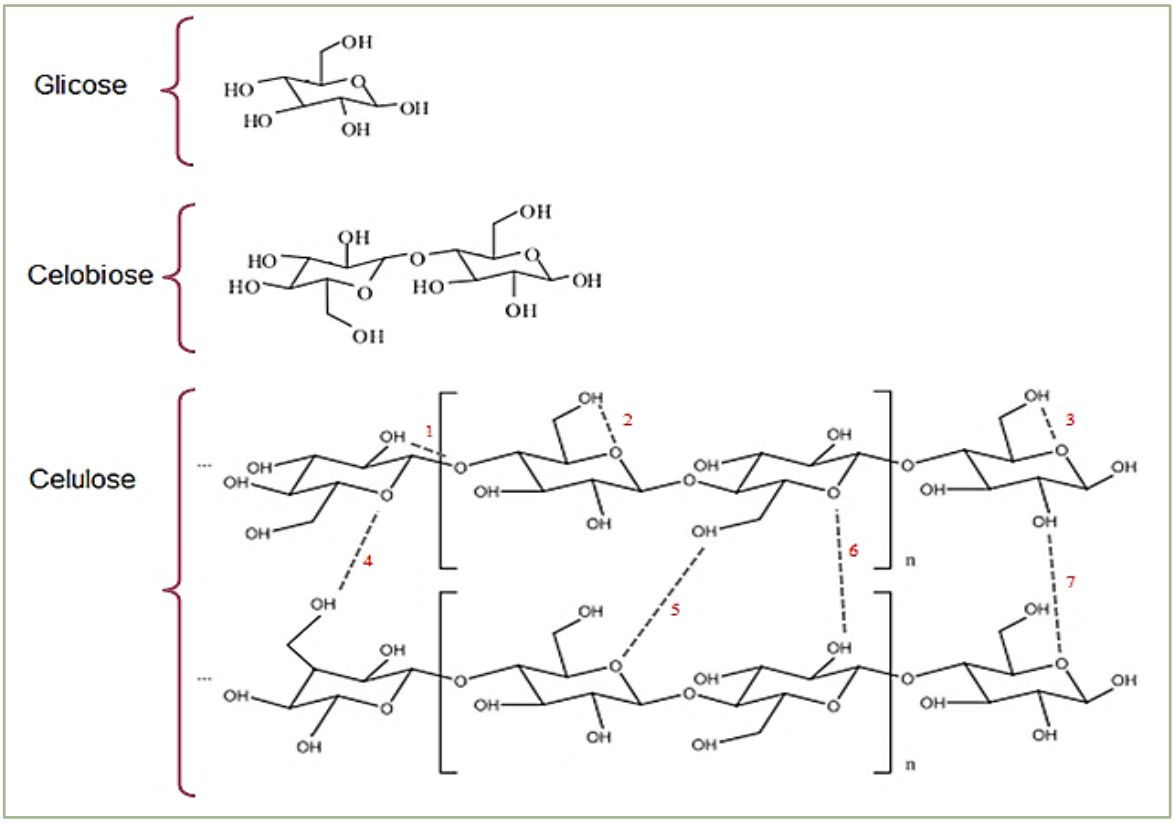
2.3.1.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo, formado por moléculas de glicose, encontrado nas plantas clorofiladas. As células destes vegetais são capazes de produzir este composto por via fotossintética, o que significa converter gás carbônico, água e energia luminosa em produtos como glicídios e gás oxigênio. Silva (2010) aponta a celulose como o material orgânico que apresenta maior disponibilidade na terra, com uma produção anual de

mais de 50 bilhões de toneladas, fazendo com que essa molécula seja um dos principais recursos naturais renováveis do planeta.

Silva (2010) destaca, ainda, que a celulose é formada por unidades recorrentes de duas moléculas de glicose eterificadas por ligações glicosídicas β-1,4. Estes dímeros de glicose são denominados celobiose e apresentam seis grupos hidroxila em sua composição, que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. No processo de hidrólise da celulose, consequentemente, são liberadas inúmeras moléculas de glicose, substrato preferencial para grande maioria dos microrganismos fermentativos capazes de gerar produtos de interesse, como etanol, ácidos orgânicos.

Por efeito das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 2.5), existe uma forte tendência de formação de cristais na celulose, tornando-a insolúvel em água e a maioria dos solventes orgânicos (Santos, 2012). As ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas conferem certa resistência à celulose; enquanto as interações intermoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal.



Fonte: Adaptado de Suhas *et al.*, 2016.

Figura 2.5 Estrutura da fração celulósica de materiais lignocelulósicos. As ligações de hidrogênio numeradas de 1 a 3 são ditas como ligações de hidrogênio intramoleculares; as identificadas de 4 a 7 são classificadas como ligações intermoleculares

Para que ocorra a construção da fibra de celulose, é necessário que aproximadamente 36 cadeias de glicose se alinhem paralelamente e eliminem as moléculas de água presentes em sua estrutura, formando microfibrilas extremamente longas e resistentes. Estas microfibrilas se arranjam dando origem as fibrilas; as hemiceluloses se encontram aderidas sobre a superfície dessas estruturas cobrindo as moléculas de celuloses, e formam o chamado domínio celulose-hemicelulose da parede celular (Maeda, 2010).

Vásquez (2007) ressalta que as fibrilas possuem regiões de elevada ordenação e rigidez, apresentando alto grau de cristalinidade e outras com menor grau de organização, as chamadas regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras são mais resistentes mecanicamente ao alongamento e à solvatação do que na região amorfa, onde a fibra possui um grau de flexibilidade superior, justamente por apresentarem uma orientação mais randomizada.

Existem duas características importantes para a classificação das celuloses: o grau de polimerização, que está ligado à quantidade de ligações glicosídicas disponíveis para a ação das celulases e pode ser definido baseando-se no número médio de monômeros e no peso molecular do polímero; e o índice de cristalinidade que está diretamente relacionado à reatividade do substrato. Estas propriedades, em conjunto com a hemicelulose e a lignina, resultam em uma macromolécula altamente resistente à hidrólise (Arantes e Saddler, 2010).

2.3.1.2 Hemicelulose

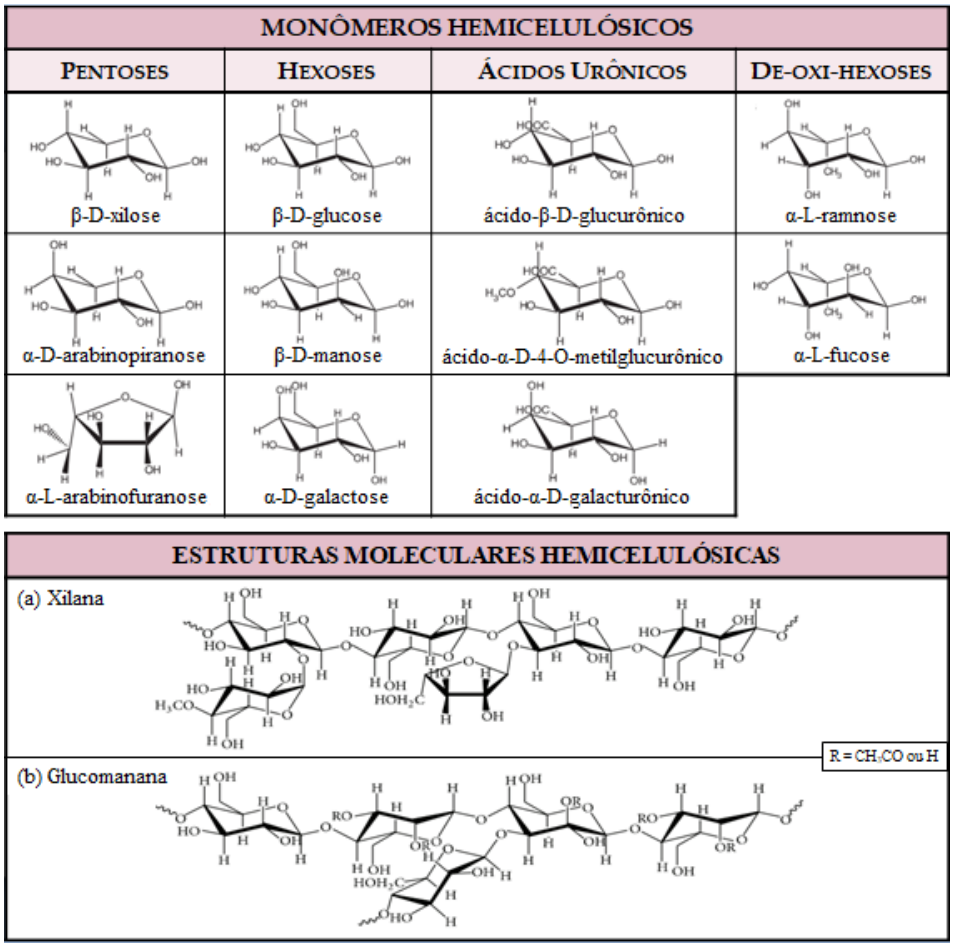
Gírio (2010) mostra que as hemiceluloses são constituintes de um grupo de heteropolissacarídeos presentes em 15-35% da biomassa das mono e dicotiledôneas, e podem ser encontradas como pentoses, hexoses e/ou ácidos urônicos. Diversos monômeros podem estar presentes em pequenas ou grandes quantidades e os grupos hidroxilas dos açúcares podem ser parcialmente substituídos pelos grupos acetil, dependendo da espécie do vegetal. O autor também aponta que homopolímeros de xilose, chamado de homoxilanas, podem ser encontrados em algas marinhas dos grupos das rodofíceas e clorofíceas.

As hemiceluloses se diferem da celulose em diversos aspectos: suas moléculas são, em geral, constituídas por 2-3 monômeros; a estrutura molecular consiste de uma cadeia linear principal com ramificações laterais curtas; os grupos hidroxila destes açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil; o grau de polimerização é muito inferior ao da celulose; não há regiões cristalinas; e principalmente, devido às hemiceluloses não apresentarem composição molecular uniforme a composição monomérica, o grau de

polimerização e as ramificações para cada molécula de hemicelulose podem variar por espécies e tipo de material de origem (Pereira *et al.*, 2003).

Uma das similaridades mais relevantes entre ambos os açúcares é que as hemiceluloses também interagem, principalmente, através de ligações glicosídicas β-(1,4) formando uma cadeia principal composta por uma molécula específica de onde surgem ramificações laterais de monômeros ou cadeias curtas de outros compostos. As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação.

As principais hemiceluloses encontradas são as xilanas e as glucomananas. Em todos os casos, há uma cadeia principal que pode ser ramificada com diferentes monômeros (Figura 2.6). As xilanas são, em grande parte, compostos da parede celular, constituindo cerca de 20-30% da biomassa das angiospermas; em algumas espécies de monocotiledôneas as xilanas podem configurar até 50% da estrutura da parede celular (Ebringerová *et al.*, 2005; *apud* Gírio, 2010).



Fonte: Adaptado de Gomes (2014) e Lee (2014).

Figura 2.6 Fórmulas estruturais das principais unidades de monossacarídeos de hemicelulose. Estruturas químicas de compostos hemicelulósicos, (a) xilana e (b) glucomanana

As glucoxilanas são as principais hemiceluloses das angiospermas, que podem conter ainda em sua estrutura uma pequena porção de glucomananas. Neste grupo de vegetais, as glucoxilanas representam 15-30% da sua massa seca. Algumas das unidades de xilose são acetiladas e uma entre dez moléculas apresentam um grupo de ácido urônico (Gírio, 2010). As moléculas que apresentam quaisquer dos ácidos urônicos em sua estrutura são mais resistentes a hidrólises ácidas se comparadas as que são compostas apenas por pentoses e hexoses (Pereira *et al.*, 2003).

Tão significativo quanto as anteriores, são as galactoglucomananas, que são as principais hemiceluloses encontradas nas gimnospermas e representam cerca de 20-25% de sua massa seca (Pereira *et al.*, 2003). Estas biomoléculas apresentam como cadeia principal de unidades lineares de β-D-glucopiranosil e β-D-manopiranosil, que podem ser parcialmente acetiladas e substituídas por unidades α-D-galactopiranosil ligadas à glicose e manose por ligações α-(1,6) (Gírio 2010).

Pereira *et al.*, em 2003, destacam ainda as arabinoglucuronoxilanas que são as moléculas de hemicelulose de maior recorrência nos vegetais de cultivo agrícola e estão também presentes nas gimnospermas. Estes sacarídeos apresentam como cadeia principal unidades lineares de β-(1,4)-D-xilopiranose apresentando ramificações de ácido úronico 4-*O*-metil-α-D-glucopiranosil e α-L-arabinofuranosil. Se comparadas com as xilanas das angiospermas, estas tendem a apresentar menos radicais acetilas em sua composição, e podem conter baixas quantidades de ácidos galacturônicos e ramnose.

De Vries e Visser (2001) evidenciam entre diversos tipos de hemiceluloses as xiloglucanas, que estão presentes nas angiospermas, em maior proporção nas dicotiledônias. Gírio (2010) afirma que estas moléculas são constituídas por cadeias principais de D-glucose, com algumas hidroxilas substituídas por D-xilose, L-arabinose e D-galactose. As xiloglucanas interagem com as microfibrilas de celulose formando ligações de hidrogênio, o que contribui para integridade estrutural de toda cadeia celulósica.

Outro heteropolissacarídeo de considerável relevância são as arabinoxilanas que, segundo os autores Shibuya e Iwasaki (1985), são as moléculas de hemicelulose de maior proporção na parede celular das monocotiledôneas. Os pesquisadores constataram que as moléculas presentes nestes vegetais são similares às xilanas encontradas nas dicotiledôneas, entretanto a proporção de L-arabinose é mais elevada. Nas arabinoxilanas, as cadeias

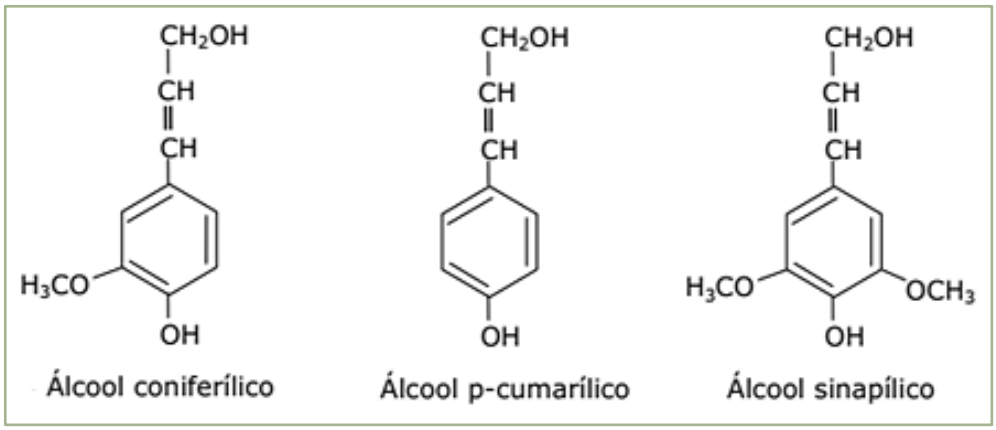
principais são constituídas de D-xilopiranose, com unidades de α-L-arabinofuranosil e de ácido urônico α-D-glicopiranosil ou ainda o derivado 4-*O*-metil.

As hemiceluloses interagem especificamente com a celulose devido à similaridade entre a cadeia principal de ambos os polissacarídeos, uma vez que as ramificações com os monômeros de xilose tendem a não formar alterações conformacionais que impeçam a interação entre as moléculas (Levy *et al.*, 1997). Os mesmos autores evidenciam que os resíduos fucosilados encontrados na parede celular são responsáveis por constituírem uma molécula mais rígida, sugerindo um papel essencial para tais resíduos.

A dimerização de compostos fenólicos esterificados também pode levar a ligações cruzadas intra e intermoleculares de xilana. As interações físicas com outros componentes da parede celular restringem a capacidade de extração da xilana. Em tecidos lignificados, por exemplo, a xilana é um éster capaz de se ligar através de suas cadeias laterais de ácido urônico a lignina (Ebringerová *et al.*, 2005; Gírio, 2010).

2.3.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula natural que se encontra associada à celulose e à hemicelulose na composição da biomassa lignocelulósica, representando de 20-30% da massa total do material. Pereira Jr. *et al.* (2008) mostram que essa macromolécula é composta por unidades de P-propilfenólico com um radical metoxilo ligado ao anel aromático e entre essas unidades existem ligações éteres formando a estrutura. Desta forma, afirma-se que a lignina é um elemento complexo e sua síntese ocorre a partir de três álcoois cinamílicos percursores, ilustrados na Figura 2.7: o álcool coniferílico, o álcool P-cumarílico e o álcool sinapílico.



Fonte: Pereira Jr. *et al*, 2008.

Figura 2.7 Precursores primários da lignina

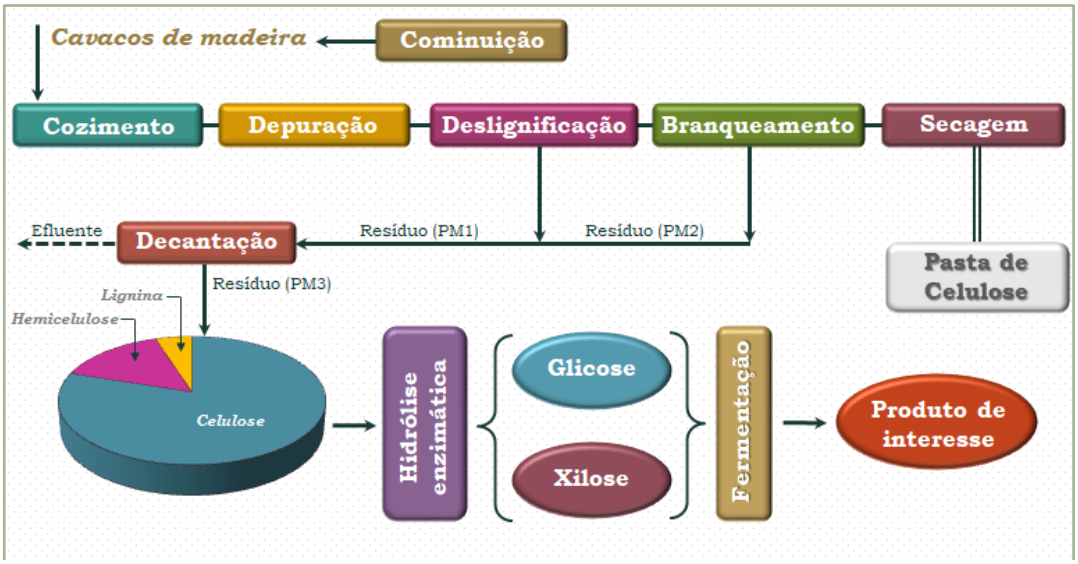
As unidades de lignina apresentam um grande número de interligações éteres, formando uma macromolécula amorfa, que atua como alicerce entre as fibrilas de celulose e como agente enrijecedor em seu interior. A adesão intermolecular entre a lignina e a celulose acontece por ação das ligações covalentes entres as cadeias de lignina e os polímeros de celulose e hemicelulose (Silva, 2010).

A estrutura da lignina varia entre espécies, assim como as demais moléculas citadas anteriormente. Sua composição randômica tem por finalidade, além da resistência mecânica, neutralizar ataques mecânicos e enzimáticos aos vegetais. Os grupos fenólicos podem se unir a outros monômeros, resultando em uma macromolécula com fortes ligações cruzadas dispostas aleatoriamente. Em teoria, essa estrutura química garante que produtos intermediários da degradação sejam compostos fenólicos altamente tóxicos, que dão ao vegetal proteção contra ataques por microrganismo.

Giannini (1997) sugere que a lignina pode ser uma fonte alternativa a ser utilizada como precursor de diversos produtos químicos em lugar aos derivados de petróleo. Entre tais produtos é possível citar antioxidantes, resinas fenólicas, solventes, preservantes de madeira, agentes sequestrantes, antivirais, estabilizantes enzimáticos, entre outros. De fato, o emprego de um pré-tratamento ideal na biomassa de origem é essencial para o uso desse material, uma vez que apresenta a estrutura molecular heterogênea e bastante complexa como dito anteriormente.

2.3.2 Polpa Celulósica

No processo de produção de papel a principal matéria-prima utilizada é a pasta de celulose, gerada a partir da madeira. No Brasil, duas espécies vegetais se destacam para tal, cerca de 85% são de espécies de Eucalipto, enquanto 15% são oriundas de espécies de Pinus. Depois de decorrido o tempo de maturidade dos vegetais, os mesmos são colhidos e submetidos a diversas etapas de produção (FIBRIA, 2018). A Figura 2.8 esquematiza as etapas de produção da pasta de celulose, bem como explica de forma sintetizada o funcionamento de uma indústria de celulose e papel.



Fonte: Adaptado de Moraes (2016).

Figura 2.8 Etapas de produção da pasta de celulose; funcionamento de uma indústria de celulose e papel

Lopes (1998) sinaliza que a primeira etapa de produção é a cominuição, aonde a madeira que chega como toras é devidamente armazenada e enviada a um descascador, sendo a casca posteriormente queimada para geração de energia. As toras descascadas seguem para um picador, onde são cortados em pedaços pequenos chamados cavacos, que são peneirados de forma que fiquem dentro de uma faixa de diâmetro estabelecida.

Após o processo de picagem, tem inicio o processo de polpação em que os cavacos são submetidos a três etapas decorrentes: cozimento, depuração e deslignificação. A etapa de cozimento tem por objetivo desassociar a lignina, extrativos e outros materiais não celulósicos presentes na matriz lignocelulósica. Para tal, o material é submetido à temperatura e pressão específicas, imersos em substâncias químicas (NaOH, Na_2S) até que se alcance a dissolução da maior parcela possível do material não celulósico (Lopes, 1998).

Ainda segundo o autor, na etapa de depuração os materiais não dissolutos no processo anterior são separados e em seguida, realiza-se a lavagem do material, para separar as fibras de celulose das substâncias extraídas durante a etapa de cozimento. Posteriormente tem-se a etapa de deslignificação que tem por objetivo a dissolução da lignina residual através de um tratamento com oxigênio. Nesse momento a lignina é retirada da biomassa celulósica através de uma segunda lavagem, resultando numa polpa pré-branqueada.

Após o processo de polpação o material é submetido a um processo de branqueamento que tem por objetivo melhorar as propriedades óticas da pasta celulósica. É um processo físico-químico em que são removidos derivados de lignina que ainda possam estar presentes no meio e adicionados produtos que modificam quimicamente as

substâncias existentes na pasta, descolorando-a (Rosa, 2003). A celulose é então enviada para as unidades de secagem, nas quais a água é retirada da mesma, até que esta atinja o ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ambiente (90% de fibras e 10% de água), obtendo-se assim uma pasta de celulose pronta para venda e uso na produção de papel.

Durante todo esse processo de produção da pasta de celulose, diversos resíduos são gerados como os resíduos da madeira provenientes do descascamento e picagem; resíduos do digestor, incluindo principalmente os insumos químicos; resíduos celulósicos do sistema de decantação, oriundos das etapas de polpação e branqueamento; entre outros.

Os resíduos celulósicos do sistema de decantação são ricos em fibras celulósicas e se liberados nos efluentes causam sérios problemas de demanda química de oxigênio e de sólidos suspensos elevados no meio. Entretanto, como esse resíduo fibroso é composto predominantemente por celulose, hemicelulose e lignina, o mesmo pode ser utilizado como matéria-prima na produção de diversos produtos de interesse industrial que conferem um valor agregado muito mais elevado que o dele próprio. Dentre esses produtos diversos ácidos orgânicos, como ácido láctico; e combustíveis líquidos, como o bioetanol, denominado, quando produzido por esses materiais, de segunda geração (Pereira Jr. *et al.*, 2008). A presente dissertação utilizou este material, proveniente do sistema de decantação de uma indústria de papel e celulose para estudos de sinergismo.

2.3.3 Bagaço da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.* é uma planta originária do sudeste asiático e representante de uma das principais famílias das angiospermas, a *Poaceae.* Classificada como um vegetal perene e típico de países tropicais, a cana-de-açúcar apresenta colmo cilíndrico composto por nós e entrenós, raiz fasciculada, folhas alternadas ou opostas e presas aos nós. Podendo chegar a 1,40 centímetros, apresentam frutos bem pequenos, do tipo cariopse. Entre seus constituintes estão a sacarose, diversos sais minerais – em destaque o cálcio e o ferro, o ácido hidrociânico e o ácido ascórbico (Moreira *et al.*, 2008).

A cana-de-açúcar é uma espécie com grande taxa de assimilação fotossintética e, por isso, com enorme capacidade para produção de biomassa contendo açúcares, amido, proteínas e lignocelulose. O Brasil se tornou o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o que representa grande prestígio para o setor de agronegócios. O aumento da demanda mundial

por bioprodutos provenientes de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis a tal cultivo, tornaram o Brasil um país de destaque para a exportação dessa biomassa (CONAB, 2018).

Ainda segundo o boletim CONAB, 2018, a produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2018/19, é de 615 milhões de toneladas, redução de 2,8% em relação à safra 2017/18 e a área colhida está estimada em 8,6 milhões de hectares. A produção de açúcar deverá atingir 35,5 milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol 1ª geração chega aos 28,2 bilhões de litros, incremento de 1,4% nessa safra em razão da maior destinação de açúcares redutores totais produzidos para etanol anidro. A produção de etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina, deverá ter aumento de 7%, alcançando 11,9 bilhões de litros, influenciado pelo consumo de gasolina nos últimos anos.

A principal etapa do processo de produção de bioetanol de 1ª geração no Brasil é a fermentação. Nas usinas destinadas para tal, a cana-de-açúcar passa por diversos sistemas de processamento. Inicialmente, a matéria-prima é lavada para retirada de sujidades, como areia e outras formas de impurezas; em sequência, o material é picado e eletromagnetizado, na intenção de retirar quaisquer materiais metálicos do meio. Após esse processo, a cana-de-açúcar picada segue para moagem, por onde passa por rolos trituradores, denominados de moendas, liberando o caldo. Cerca de 70% do produto original geram esse caldo e 30% passam a bagaço (NOVACANA, 2018).

O caldo de cana-de-açúcar gerado passa então por um processo de eliminação de impurezas, através de peneiras e, logo em seguida, para o tanque de decantação. Após esse processo, o caldo é extraído e torna-se um caldo clarificado. O último processo de extração de impurezas é a esterilização, operação na qual o caldo é aquecido a temperaturas de aproximadamente 90ºC para eliminação de contaminantes. O caldo estéril é levado, então, para o tanque de fermentação e inoculado com microrganismos específicos capazes de gerar os produtos de interesse no processo (NOVACANA, 2018).

O bagaço de cana-de-açúcar gerado no processo de moagem para extração do caldo é, em grande parte, queimado para gerar energia nas usinas. Entretanto, também é considerada uma biomassa rica, capaz de gerar diversos produtos como o próprio etanol, ácidos orgânicos, biopolímeros, entre outros. Sua composição típica é de aproximadamente 33% de celulose, 30% de hemicelulose, 19% de lignina, 6% de materiais extractíveis e 2% de cinzas (Pereira Jr., 1991).

Giannini (1997) relata que em virtude do bagaço de cana-de-açúcar ser um dos resíduos agrícolas que apresenta maior destaque na agroindústria nacional, o mesmo pode ser indicado para gerar bioprodutos, posto que praticamente todas as frações da biomassa podem ser convertidas nas mais diversas aplicações. A Tabela 2.3 apresenta a série histórica do crescimento na produção de cana-de-açúcar e consequente geração de seus resíduos no período dos últimos nove anos, o que corrobora com a afirmação do autor de ser uma das biomassas nacionais mais relevantes até os dias atuais. Estima-se que em torno de 27% em massa do total de cana-de-açúcar seja referente ao bagaço e 14% a palha (CONAB, 2018).

Tabela 2.3 Série histórica da produção de cana-de-açúcar e seus resíduos em território nacional

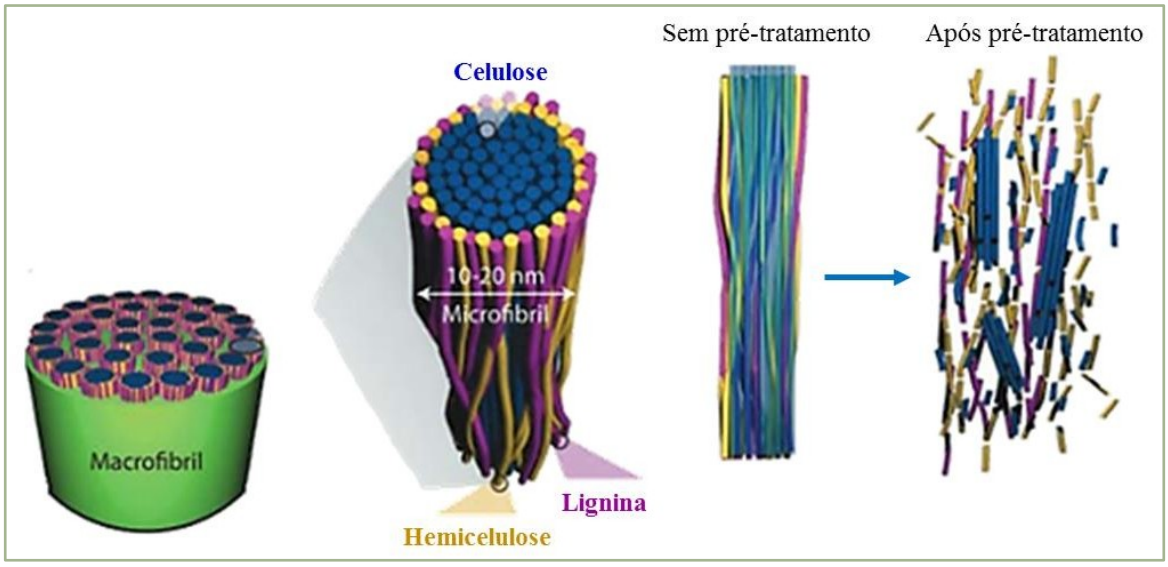
Ano Agrícola	Cana-de-açúcar (milhões t)	Bagaço de cana (milhões t)	Palha de cana (milhões t)
2010	623,91	168,45	87,35
2011	560,95	151,46	78,53
2012	588,91	159,01	82,45
2013	658,82	177,88	92,23
2014	634,77	171,39	88,87
2015	665,59	179,71	93,18
2016	657,18	177,44	92,01
2017	633,26	170,98	88,66
2018/19	615,84	166,28	86,22

Fonte: CONAB, 2018.

O presente trabalho fez uso também do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado como biomassa central, utilizando-a para os estudos de sinergismo, otimização de sistema e produção de ácido lático.

2.4 Pré-tratamentos para materiais lignocelulósicos

Os pré-tratamentos têm o propósito de alterar estrutura da matriz lignocelulósica, separando as frações constituintes da mesma (Figura 2.9), aumentando o acesso à celulose e à hemicelulose, o que leva ao seu aproveitamento eficiente e praticamente integral quando submetido ao ataque enzimático, por exemplo. Para que se obtenham altos rendimentos de hidrólise enzimática, o pré-tratamento é de fundamental importância, uma vez que a base desses materiais encontra-se fortemente “blindada” por suas moléculas estruturais.



Fonte: adaptado de Rose *et al.* (2015).

Figura 2.9 Esquema da microfibra de material lignocelulósico submetida a um processo de pré-tratamento. O processo rompe as ligações de hidrogênio e interações glicosídicas para aumentar a acessibilidade às frações C5 e C6 da matriz celulósica

Os pré-tratamentos da biomassa podem ser classificados como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os pré-tratamento físicos têm por finalidade a redução do tamanho das fibras e, consequente, aumento da área de superfície do material. Entre os principais pré-tratamento físicos, podem ser apontados, segundo Zheng *et al* (2009): a moagem em moinho de bolas, pressão e rolo duplo; as altas temperaturas; e a explosão a vapor; e a radiação, com raios gama ou micro-ondas. Alguns desses tipos de pré-tratamento necessitam de maior demanda energética, dependendo do tempo de residência, e determinados autores apontam isso como desvantagem no desenvolvimento de um processo industrial.

Os pré-tratamento químicos têm por objetivo aumentar a acessibilidade e biodegradabilidade da celulose, frente à remoção da lignina e dependendo do pré-tratamento, extração também da hemicelulose, bem como a redução de seu grau de polimerização e diminuição da cristalinidade da celulose (Zheng *et al.*, 2009). Esse tipo de pré-tratamento inclui o uso de certo agente químico, como um ácido ou base, um solvente orgânico, um agente oxidante ou redutor, entre outros. Esses pré-tratamento podem também ser submetidos a altas temperaturas e pressões, estabelecendo os chamados pré-tratamentos físico-químicos.

Zheng *et al.* (2009) afirmam que os protocolos mais aplicados como pré-tratamento físico-químico em biomassa lignocelulósica são os que utilizam ácidos inorgânicos e/ou bases, na intenção de desconstruir a matriz desse material e facilitar o acesso à celulose e/ou hemicelulose na etapa de hidrólise. No pré-tratamento com ácidos diluídos, os ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico e nítrico ganham destaque. Os autores resumem a forma de

atuação desses ácidos como a solubilização da fração hemicelulósica do material, preservando de forma quase que completa a lignina e a fração celulósica. Os mesmo atestaram que processos com esse tipo de pré-tratamento, e utilizando ácido sulfúrico diluído, obtiveram rendimentos de remoção da xilose – referindo-se a fração hemicelulósica, de mais de 90% do valor teórico.

Entretanto, o uso de ácido diluído como pré-tratamento tem algumas desvantagens relevantes, como, por exemplo, a necessidade da redução do tamanho das partículas da biomassa antes do processo, o que adiciona mais uma etapa ao mesmo, a corrosão eventual de equipamentos, a necessidade de neutralizar esses pré-hidrolisados produzidos antes da etapa de fermentação – mais custo com insumos, e a posterior eliminação dos sais de neutralização, que também se faz necessária, e formação de produtos inibidores de fermentação (Zheng *et al.,* 2009).

Ainda no âmbito dos pré-tratamento estão os pré-tratamento alcalinos, assim definidos por fazerem uso de diversas bases como hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, hidróxido de amônia ou a amônia aquosa, entre outros. Os pré-tratamento alcalinos são basicamente uma técnica de deslignificação do material, onde ocorre também a solubilização de uma parcela significativa da fração hemicelulósica. Valadares (2013) explicita que os pré-tratamento alcalinos viabilizam também a remoção de extrativos e grupos ligados na forma éster às hemiceluloses, o que ocasiona maior acessibilidade enzimática à superfície da celulose e da hemicelulose disponíveis no meio.

Os pré-tratamentos biológicos propõem a degradação do complexo lignocelulósico por microrganismos, como fungos e bactérias, capazes de modificar a composição química e/ou estrutura da biomassa. Dessa forma, é possível afirmar que pré-tratamento biológicos auxiliam na degradação da lignina e da hemicelulose, bem como na formação de celulose amorfa. A degradação de lignina por fungos, por exemplo, acontece através da ação de enzimas degradadoras de lignina, como peroxidases e lacases, que são produzidas por esses microrganismos (Alvira *et al.,* 2010). Os pré-tratamento biológicos tendem a ser uma técnica promissora, uma vez que apresentam vantagens como a necessidade apenas dos biocatalisadores para que as reações ocorram, o menor custo de energia de entrada quando comparado aos demais pré-tratamento e a utilização de condições ambientais brandas.

Cabe ressaltar que cada tecnologia de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens. Diversos fatores devem ser considerados para a seleção do mesmo, tais como: a

otimização do processo de separação das frações integrantes do material; a diminuição de formação de produtos inibidores; o aumento da fermentabilidade dos hidrolisados; a redução da demanda energética e dos custos do processo (Gírio *et al.*, 2010). Assim, deve-se considerar a sinergia entre esses parâmetros, definindo um modelo, associado com a eficiência dos processos de hidrólise a fim de se obter rendimentos e taxas máximos de fermentação (Betancur, 2010).

2.4.1 Pré-tratamento Alcalino

O pré-tratamento alcalino é um dos principais processos de pré-tratamento químico e recebe muita atenção na sociedade acadêmica, gerando incontáveis estudos e publicações. Como mencionado anteriormente, tal pré-tratamento é assim definido dada a possibilidade de utilização de diversas bases inorgânicas. O pré-tratamento alcalino consiste essencialmente em um processo de deslignificação, onde uma quantidade significativa de hemicelulose também pode ser solubilizada.

Os pré-tratamento alcalinos aumentam a acessibilidade à celulose e à hemicelulose da matéria-prima lignocelulósica, uma vez que são eficazes na solubilização de lignina, e apresentam menor eficiência na solubilização das demais frações do material quando comparado aos outros processos (Carvalheiro *et al.*, 2008). Esse tipo de pré-tratamento pode ser executado à temperatura branda e com intervalos de tempo variando de minutos a dias. Por causar menos degradação dos açúcares fermentáveis que o PT ácido, por exemplo, mostra-se mais eficaz em resíduos agrícolas (Kumar *et al.*, 2009).

Estudos indicam que o mecanismo de ação que advém é a saponificação – hidrólise alcalina – de ligações ésteres inter moleculares presentes nas hemiceluloses e lignina, principalmente. Esse processo remove também o grupo acetil e diversas substituições de ácido urônico da hemicelulose, que são responsáveis por reduzir a acessibilidade da mesma, bem como da celulose na hidrólise enzimática (Zheng *et al.,* 2009).

Entretanto, a provável perda de açúcares fermentáveis e a geração de compostos inibitórios ao processo precisa ser considerada para otimização das condições do sistema, que não é, entretanto, exclusiva desse pré-tratamento. Os hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são as bases mais utilizadas. O hidróxido de sódio aumenta a superfície interna da celulose e diminui o grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca ruptura na estrutura

da lignina. Tem sido relatado na literatura que essa base é capaz de aumentar a digestibilidade de determinadas madeiras, reduzindo o teor de lignina de 20% para 9% (Maeda, 2010).

Na presente dissertação, fez-se uso desse tipo de pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que um dos principais objetivos era observar a interação e sinergismo entre as enzimas hidrolíticas: celulásicas e hemicelulases.

2.5 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares simples pode ser obtida por duas metodologias distintas: hidrólise química, onde se utilizam os ácidos diluídos ou concentrados, ou hidrólise enzimática.

De acordo com Zheng *et al.* (2009), a via ácida é caracterizada por ser um processo rápido. Entretanto, apresenta desvantagens como a necessidade de equipamentos resistentes a corrosão e que ofereçam segurança operacional para tal. Além disso, pelo fato da fração hemicelulósica ser hidrolisada de forma mais rápida e eficiente quando comparada à celulósica, ocorre liberação natural de produtos inibitórios à fermentação, como os produtos de alguns monômeros hemicelulósicos e ácidos urônicos.

A via enzimática se destaca pelas condições brandas de reação, onde pH, temperatura e pressão não apresentam prejuízo ao ambiente, quando em comparação a hidrólise ácida. Essa metodologia apresenta também alta especificidade e não gera produtos inibidores para etapa de fermentação, uma vez que apresenta maior rendimento de hidrólise. Porém, quando ponderadas as desvantagens, tornam-se relevantes o tempo de reação que, quando comparado a via ácida é bastante longo e o custo elevado para obtenção das enzimas (Li *et al.,* 2005; Bollók e Réczey, 2000 *apud* Rocha, 2014).

2.5.1 Hidrólise Enzimática

A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis é um campo que ganha grande atenção na pesquisa por ser primordial na geração de bioenergia e produtos. Na hidrólise enzimática, a parte celulósica e hemicelulósica da biomassa pode ser convertida por enzimas de alta especificidade em açúcares solúveis, possibilitando a conversão do material via fermentativa, gerando bioprodutos de interesse.

Apesar de o custo ser elevado para obtenção dos biocatalisadores, o processo enzimático destaca-se como econômico do ponto de vista energético e metalúrgico, uma vez que os equipamentos não necessitam ser produzidos com materiais especiais. Os processos de hidrólise enzimática do material celulósico e conversão dos açúcares gerados em moléculas de interesse podem ser carreados de duas formas distintas: Sequencial – Processo de hidrólise separada da fermentação (SHF); ou Simultânea – Processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) (Castro e Pereira Jr, 2010).

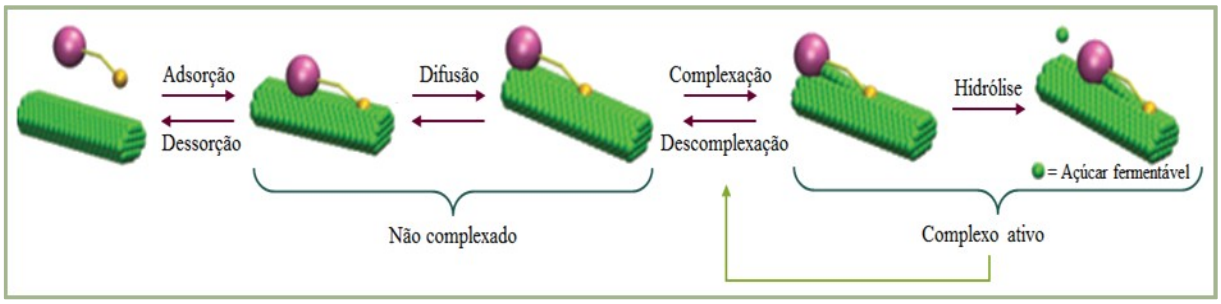
Os autores afirmam ainda que o processo SSF demanda menor investimento financeiro, uma vez que ambas as etapas do sistema são realizadas em um mesmo vaso reacional. Nesse processo, as enzimas são menos propensas a inibição pelos produtos de hidrólise, uma vez que o açúcar liberado passa a ser simultaneamente fermentado. A reação de hidrólise é favorecida devido à baixa concentração de açúcares no meio, o que leva ao deslocamento do equilíbrio da reação para a geração de mais açúcares, que não mais conferem efeito inibidor a ação enzimática.

O processo de hidrólise separada da fermentação ostenta como uma das principais vantagens frente ao processo anterior, a possibilidade de ambas as etapas de produção serem conduzidas em condições ótimas. As enzimas, em geral, apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas em torno de 50ºC, o que costuma ser temperatura alta para grande parte dos microrganismos fermentativos. Deve-se considerar ainda que, como não há partículas em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema. Entretanto, a desvantagem observada está relacionada ao acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, que causam inibição às enzimas e a redução na conversão final de glicose (Castro e Pereira Jr, 2010).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é catalisada por enzimas lignocelulolíticas e classificada como catálise heterogênea, uma vez que o substrato (sólido) e o meio reacional se encontram em diferentes estados físicos. Pelo fato do substrato ser insolúvel, o processo requer enzimas solúveis que possuam afinidade e reajam positivamente à interface sólido-líquido (Xu *et al.*, 2008).

A Figura 2.10 ilustra um processo de hidrólise catalisado por uma enzima e suas etapas: 1. Difusão da enzima em direção ao substrato; 2. Adsorção da enzima ao substrato e consecutiva difusão a superfície do mesmo; 3. Formação do sítio ativo enzima-substrato; 4.

Reação de hidrólise no complexo ativo; 5. Descomplexação do complexo ativo enzima-substrato; 6. Dessorção da enzimática.



Fonte: adaptado de Rose *et al.* (2015).

Figura 2.10 Exemplo das etapas de hidrólise enzimática catalisada por uma exoglucanase com módulo de ligação ao carboidrato (CBM)

Alvira *et al.* (2010) mostram que os principais fatores limitantes da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos estão divididos em duas categorias: os relacionados à enzima e os relacionados ao substrato, estando os dois fatores interligados durante todo o processo de hidrólise.

Entre os fatores relacionados ao substrato, os autores destacam: índice de cristalinidade da celulose, grau de polimerização, porosidade, tamanho de partículas, acessibilidade à área superficial, presença de lignina e hemicelulose e espessura da parede celular. Já entre os fatores relacionados à enzima, consideram-se: concentração enzimática, capacidade de adsorção da enzima, sinergia entre as enzimas do complexo, inibição pelo produto, desativação mecânica, ligações improdutivas à lignina, atividade enzimática (Andersen, 2007).

A diminuição na severidade do pré-tratamento do material muitas vezes se faz necessária na intenção de reduzir o custo do investimento no processo. No entanto, essa redução nas condições severas do pré-tratamento tem como consequência baixa liberação de açúcares e, desta forma, fazem-se necessárias maiores concentrações enzimáticas e um *pool* enzimático mais heterogêneo para atingir altos índices de rendimento.

Segundo Dimarogona *et al.* (2013) a presença em um coquetel enzimático de proteínas não hidrolíticas, também denominadas de proteínas auxiliares, tende a reduzir o grau de cristalinização da biomassa, favorecendo o processo de hidrólise enzimática. Entre essas, podem ser citados os módulos de ligação ao carbono (CBMs) que são pequenos peptídeos capazes de se conectar as cadeias de polissacarídeos gerando irregularidades na superfície das fibras, com rompimento das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose; as expansinas vegetais que aumentam a extensão das fibras e consequente provocam

afrouxamento e desarranjo da parede celular, mostrando também funcionalidade em solubilizar açúcares oligoméricos; as expansinas microbianas similares as expansinas vegetais, são capazes de provocar desorganização da parede celular e auxiliam na interação entre microrganismos e vegetais; as swoleninas que provocam turgescência nas paredes da fibra, promovendo também o desarranjo da parede celular; e as monooxigenases que são capazes de realizar clivagem oxidativa na fração cristalina da celulose (*apud* Mendez, 2016).

Nesse contexto, são imprescindíveis preparados enzimáticos que contenham celulases, hemicelulases e outras enzimas acessórias para auxiliar na degradação integral do material lignocelulósico. Atualmente, sabe-se da importância de conseguir complexos enzimáticos balanceados, que apresentem proporções ótimas a fim de modificar efetivamente a complexa estrutura desses materiais (Alvira *et al.*, 2010).

2.6 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Diversas enzimas com capacidade para degradação do material lignocelulósico estão disponíveis no meio ambiente. A decomposição deste material requer basicamente a ação de quatro grandes grupos enzimáticos: celulases, hemicelulases, ligninases e pectinases. No quadro 2.1 é apresentado um resumo das principais enzimas lignocelulolíticas (Van Dyk e Pletschke, 2012).

FRAÇÃO POLIMÉRICA	ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS
Celulose	Endoglucanase, celobiohidrolase, β-glucosidase
Hemicelulose	Endo-xilanase, β-xilosidase, endo-mananase, acetil xilana esterase, α-L-arabinofuranosidase, α-galactosidase
Lignina	Lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase
Pectina	Pectil metil esterase, poligalacturonase

Fonte: Van Dyk e Pletschke, 2012.

Quadro 2.1 Algumas das principais enzimas degradadoras do material

2.6.1 Celulases

As celulases pertencem à classe das glicosil hidrolases, grupo de enzimas que apresentam especificidade pelas ligações glicosídicas β-1,4 presentes na celulose e catalisam o processo de hidrólise da fração celulósica do material atuando nas ligações moleculares entre dois ou mais carboidratos e/ou entre um carboidrato e outro composto molecular. De

acordo com a *Enzyme Commission* (EC) da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), as enzimas desse grupo são identificadas com o código EC 3.2.1.x, onde o valor atribuído ao x é referente à enzima avaliada (Henrissat, 1991).

O consórcio enzimático de celulases é formado por três grupos e sua classificação considera o local de atuação das enzimas no substrato celulósico: endoglucanases, que atuam nas regiões internas da fibra celulósica; exoglucanases, que clivam as ligações externas da celulose; e β-glucosidades, capazes de hidrolisar oligossacarídeos solúveis em glicose. O Quadro 2.2 mostra de forma resumida a classificação das celulases de acordo com a IUBMB (Castro e Pereira Jr, 2010).

As endoglucanases (EnG) catalisam a hidrólise da celulose iniciando o processo de clivagem aleatoriamente nas regiões internas da estrutura amorfa da fibra, liberando oligossacarídeos no meio (Lynd *et al.*, 2002). Por não apresentarem tantas ligações de hidrogênio intermoleculares quanto às regiões cristalinas, as regiões amorfas das moléculas de celulose são melhor hidrolisadas no processo. No entanto, algumas EnG também são capazes de atuar em celulose cristalina (Castro e Pereira Jr, 2010).

O grupo das exoglucanases (ExG) é formado por dois subgrupos enzimáticos, o das glucano-hidrolases (GH) e o das celobiohidrolases (CBH). As GH cujo nome sistemático é 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase, apesar de pouco reportadas, são de estimada importância, uma vez que no processo de hidrólise da fibra celulósica liberam glicose diretamente do polímero (Castro e Pereira Jr, 2010).

CÓDIGO E.C.	NOME OFICIAL	NOMES ALTERNATIVOS	REAÇÃO CATALISADA
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglucan hidrolase; Beta-1,4-glucanase; Carboximetil celulase; Celodextrinase; Endo-1,4-β-D-glucanase; Endo-1,4-β-D-glucanohidrolase; Endo-1,4-β-glucanase; Endoglucanase	Endohidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e β-glucanas.
3.2.1.21	β-glucosidase	Amigdalase; β-D-glucosidegluco-hidrolase; Celobiase; Gentobiase.	Hidrólise do terminal, β-1,4-D-glicosídeo com liberação de glicose.

CÓDIGO E.C.	NOME OFICIAL	NOMES ALTERNATIVOS	REAÇÃO CATALISADA
3.2.1.74	Glucan 1,4-β glucosidase	1,4-β-D-glucanagluco-hidrolase; Exo-1,4-beta-D-glucosidase; Exo-1,4-beta-glucanase; Exo-1,4-beta-glucosidase.	Hidrólise de ligações β-1,4 em β-D-glicanas com remoção sucessiva de unidades de glicose.
3.2.1.91	Celulose 1,4-β celobiosidase	1,4-β-celobiohidrolase; 1,4-β-D-glucana celobiohidrolase; Avicelase; Exo-1,4-β-D-glucanase; Exocelobiohidrolase; Exoglucanase.	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas em celulose, celohexose e celotetraose, liberando celobiose.

Quadro 2.2 Classificação das celulases de acordo com a IUBMB: códigos Enzyme Comission (E.C.), nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas

De acordo com Awafo *et al.* (1996), as celobiohidrolases possuem o nome sistemático 1,4-β-D-glucana-celobio-hidrolase participam da hidrólise primária das fibras celulósicas. Estas são responsáveis pela amorfogênese e ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação fibrosa do material, com o aumento das regiões intersticiais. As CBH são separadas em dois tipos: as enzimas do tipo I (CBH I) que hidrolisam terminais redutores, e as do tipo II (CBH II) que hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise – celobiose.

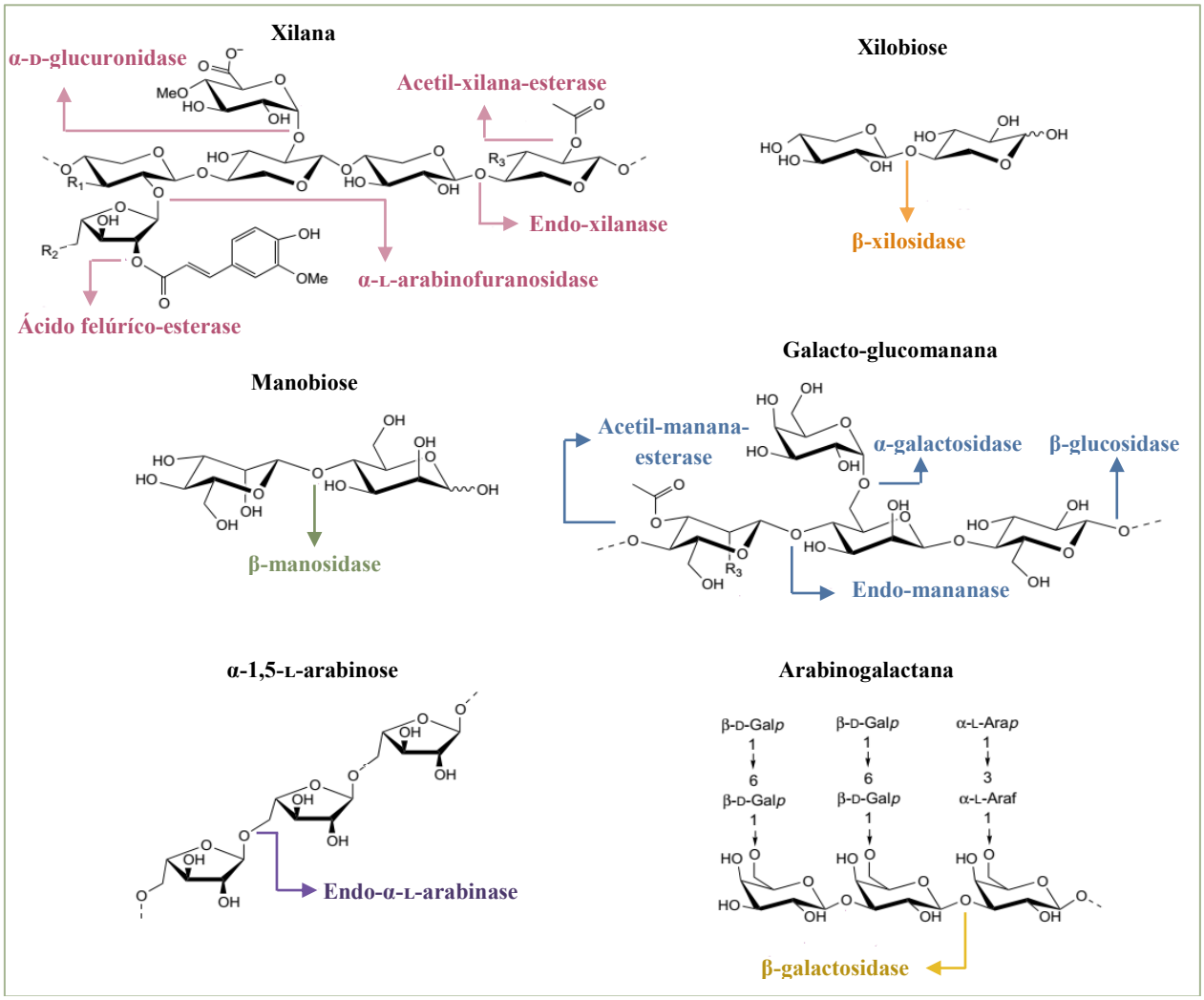
O outro grupo enzimático do complexo celulolítico engloba as enzimas β-glucosidases (BG), ou as β-glicosídeo-glucohidrolases. As BG são capazes de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) à glicose. Assim como as enzimas citadas anteriormente, também sofrerem inibição pelo produto final da sua hidrolise (Awafo *et al.*, 1996). Esse grupo de enzimas pode ser dividido em três subgrupos baseados na especificidade pelo substrato: as aril-β-glucosidases, que têm afinidade por oligossacarídeos de cadeias pequenas; as celobiases, que realizam a hidrolise apenas de celobiose, liberando glicose; e as *broad-specificity*-β-glucosidases (mais facilmente encontradas), que atuam tanto em dissacarídeos quanto oligossacarídeos (Riou *et al.* 1998).

2.6.2 Hemicelulases

A hemicelulose é a é o segundo mais abundante componente da biomassa vegetal no planeta e representa 25 a 35% dos materiais lignocelulósicos. Como discutido anteriormente, as hemiceluloses apresentam estruturas muito mais complexas quando comparadas a celuloses, são polímeros heterogêneos construídos por pentoses, hexoses e

ácidos urônicos. Desta forma, a degradação da fração hemicelulósica requer *pools* enzimáticos mais elaborados (Kumar, 2008).

Kumar (2008) exemplificou o processo de degradação da xilana, que necessita de diversas enzimas como: endo-1,4-β-xilanase, β-xilosidase, α-glucuronidase, α-L-arabinofuranosidase e acetilxilana-esterase. Na degradação da glucomanana, a β-mananase e a β-manosidase clivam o esqueleto do polímero. Assim como a celulose, a hemicelulose é também é fonte de açúcares fermentáveis para aplicações em biorrefinarias. A figura 2.11 mostra algumas das principais estruturas hemicelulósicas e seus biocatalisadores.



Fonte: Adaptado de Shallom e Shoham, 2003.

Figura 2.11 Estrutura química da hemicelulose e as enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de degradação do polímero

Segundo Gírio (2010), as xilanases são um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise das xilanas. As principais enzimas que clivam as ligações glicosídicas da estrutura da xilana são as endoxilanases (β-1,4-xilana-xilanohidrolase; EC 3.2.1.8) e β-xilosidases (β-1,4-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.37). As endoxilanases clivam as ligações glicosídicas na

xilana e reduzem o grau de polimerização do substrato. O ataque à xilana não é aleatório, as ligações definidas para hidrólise dependem da molécula do substrato, isto é, do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e da presença de monômeros. Os principais produtos de hidrólise são os oligômeros de β-D-xilopiranose, mas na fase posterior podem ser produzidas pequenas moléculas tais como mono-, di- e trissacarídeos de β-D-xilopiranose.

As β-xilosidases são altamente específicas para dímeros ou pequenos oligossacarídeos de xilose (grau de polimerização até 4.0), e sua ação é catalisar a hidrólise desses sacarídeos a partir de terminais não redutores para produção de moléculas de xilose. A habilidade da β-xilosidade de liberar xilose de xilooligossacarídeos foi estudada para determinar sua especificidade ao substrato (De Vries e Visser, 2001). Igualmente seria se a cadeia principal fosse formada por mananas, as enzimas envolvidas na hidrólise seriam as endo-β-mananases e das β-manasidases (Van Dyk e Pletschke, 2012).

No grupo das xilanases estão presentes também algumas enzimas acessórias, que rompem as ramificações laterais, atuando sob os monômeros ligados a cadeia principal (Gírio, 2010). Entre elas estão as enzimas citadas no Quadro 2.3 e suas respectivas reações.

CÓDIGO E.C.	NOME OFICIAL	REAÇÃO CATALISADA
3.2.1.139	α-D-glucuronidase	Hidrólise das ligações α-1,2 de ácido glucurônico e as unidades de β-D-xilopiranoxilo presentes na glucurono-xilana;
3.2.1.55	α-L-arabinofuranosidase	Remove resíduos de L-arabinose nas posições 2 e 3 β-D-xilopiranosil;
3.1.1.72	acetilxilana-esterase	Remove os grupos *O*-acetil das posições 2 e/ou 3 nos resíduos β-D-xilopiranosilo de acetil xilana;
3.1.1.73	ácido ferúlico e ácido P-cumárico esterase	Hidrólise de ligações éster da xilana, liberando os respectivos ácidos fenólicos ligados aos resíduos de ácido acetil arabinofuranosido.

Fonte: Gírio, 2010.

Quadro 2.3 Enzimas xilanásicas acessórias e suas respectivas reações hidrolíticas

2.7 SINERGISMO

Sinergismo pode ser definido pela cooperação entre as enzimas presentes em um mesmo complexo enzimático. Kumar e Wyman (2009) descreveram sinergismo como "*a razão entre o rendimento das enzimas quando atuam em conjunto pela soma do rendimento*

de cada uma delas atuando individualmente na mesma quantidade que as utilizadas na mistura". Outra teoria é que, em um processo sinérgico, o produto da ação de uma enzima é o substrato para outras enzimas, o que aumenta o rendimento total de obtenção do produto final (Lynd *et al.*, 2002).

O sinergismo pode ser classificado de três formas diferentes: Sinergismo positivo, quando o resultado final do cálculo da razão proposta anteriormente é >1.0, o que significa que há colaboração por uma ou ambas as partes, ou seja, as enzimas se ajudam mutuamente e há um ganho no rendimento final; Sinergismo negativo: acontece quando o resultado final é <1.0, indicando que ao incorporar determinada enzima no meio, uma ou outra enzima apresenta sua eficiência reduzida, prejudicando o rendimento final; Sinergismo neutro: caso resultado desta razão for igual a 1.0 não há sinergismo entre as enzimas, o acréscimo de determinada proteína no meio não gera benefícios, nem tão pouco prejuízos.

Van Dyk e Pletschke (2012) afirmam que estudos de sinergia são usados para explicar o mecanismo específico de ação de determinadas enzimas e a interação entre elas. Isto é, em geral, realizado com uso de enzimas puras em substratos pré-definidos. Também se utiliza enzimas puras em combinação para definir as ligações que têm maior contribuição para a recalcitrância do substrato. No entanto, diversos estudos utilizam misturas comerciais ou brutas para otimizar a hidrólise de substratos lignocelulósicos. Os resultados podem ser mais complexos quando não é feito o uso de enzimas puras, uma vez que atividades adicionais em misturas de enzimas podem impactar o resultado.

2.7.1 Sinergia do Complexo Celulásico

Para hidrólise eficiente da celulose, um sistema de reação heterogêneo deve ser modelado para atuação sinérgica das diversas enzimas do complexo celulásico. Desta forma, é possível afirmar que o sinergismo entre todas as celulases é dito, em geral, como cooperação entre elas. O processo de degradação da celulose se inicia com as endoglucanases, que clivam as ligações β-1,4 internas da celulose originando novas exterminadas na cadeia polimérica, que passam a servir como substratos para as exoglucanases (Maeda, 2010).

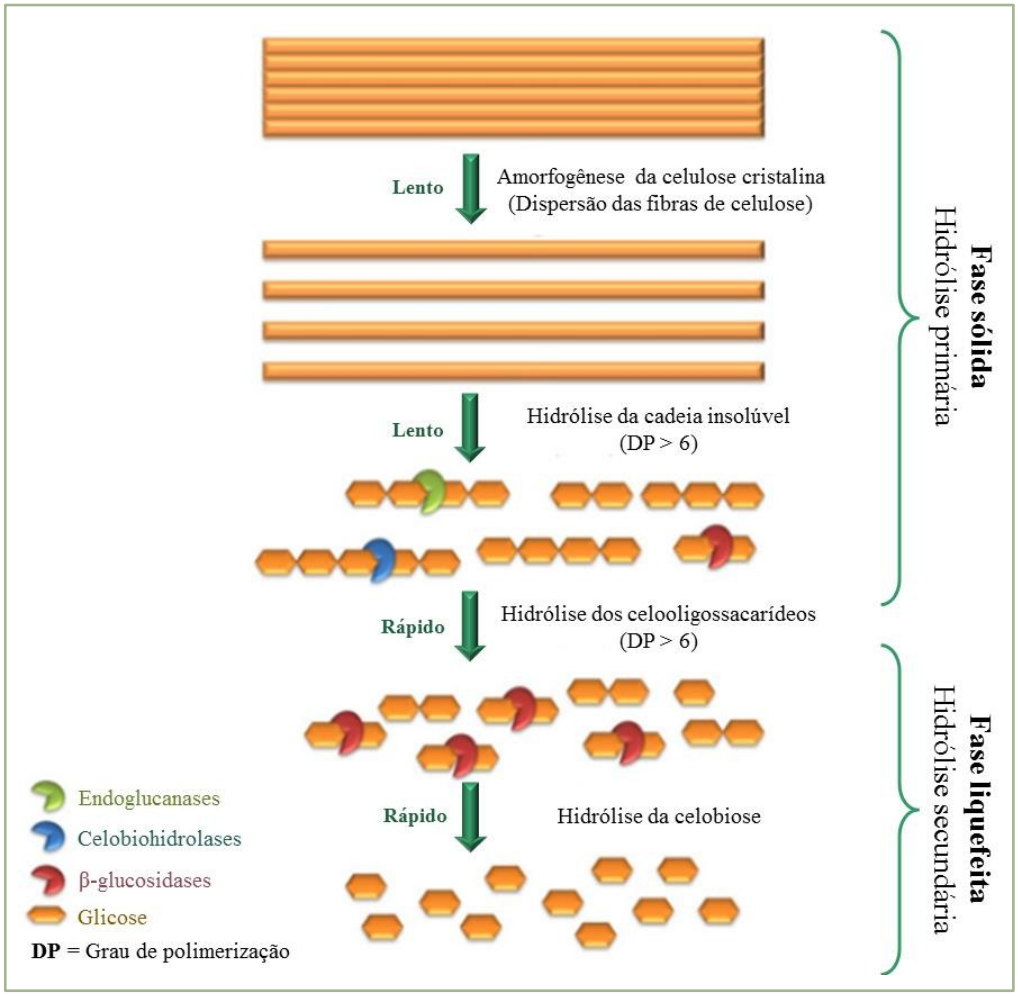
Em consequência, as celobio-hidrolases (ExG) iniciam o processo de clivagem dos oligassacarídeos convertidos pelas EnG e junto a elas, liberam celobioses e oligossacarídeos menores, que servem de substrato para β-glucosidase. As β-glucosidases são,

por fim, capazes de catalisar a conversão da celobiose e de alguns oligossacarídeos em glicose, findando com a celobiose presente no meio e, por consequência, a inibição sofrida pelo produto, particularmente pelas exoglucanases (Arantes e Saddler, 2010). A Figura 2.12 esquematiza um processo de hidrólise de fibras de celulose pela ação de enzimas celulásicas. Atualmente, podem ser descritos três tipos de sinergismo principais, relatados no Quadro 2.4:

AÇÃO SINÉRGICA	ATUAÇÃO ENZIMÁTICA
EnG-ExG	Endoglucanases atuam nas regiões amorfas da fibra de celulose e disponibiliza oligossacarídeos com terminais redutores e não redutores para atuação das exoglucanases CBH I e CBH II, respectivamente;
ExG-ExG	CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados pela ação da endoglucanase;
ExG-BG e EnG-BG	Celobio-hidrolases e a endoglucanase liberam como produtos de hidrólise celobioses e oligossacarídeos, respectivamente, que servem de substrato para a β-glucosidase.

Fonte: Castro e Pereira Jr, 2010.

Quadro 2.4 Principais formas de sinergismo entre enzimas do complexo celulolítico



Fonte: Arantes e Saddler, 2010.

Figura 2.12 Esquema da hidrólise enzimática da celulose

2.7.2 Sinergia do Complexo Hemicelulásico

Para que a hidrólise da hemicelulose seja completa e eficiente, faz-se necessária a ação sinérgica das enzimas do complexo hemicelulásico para clivagem tanto da cadeia principal quanto das ramificações laterais. Em virtude da natureza heterogênea da hemicelulose e aos mais diversos produtos formados durante sua degradação, o estudo sinérgico das hemicelulases torna-se muito mais complexo do que o que se observa entre as celulases.

Kovács (2009) elucidou três formas recorrentes de sinergia entre as hemicelulases: homo-sinergia, hetero-sinergia e anti-sinergia. A homo-sinergia acontece entre dois ou mais tipos de enzimas capazes de clivar a cadeia principal ou entre dois ou mais tipos de enzimas capazes de clivar cadeias laterais. Como exemplo dessa forma de sinergia, está a interação entre xilanases capazes de clivar as ligações glicosídicas da xilana, como as endoxilanases e as β-glucosidases, ou entre a ácido ferúlico-esterase e α-arabinofuranosidase.

Outra interação sinérgica é a hetero-sinergia, que acontece entre enzimas que clivam as cadeias principais e laterais, como por exemplo, entre acetil xilano-esterases e endoxilanases. E o terceiro e último tipo de sinergismo constatado entre as hemicelulases é o anti-sinergismo que acontece quando a atividade de uma enzima inibe a ação de outra. A título de exemplo, tem-se a remoção de arabinose pela α-arabinofuranosidase, que inibe a ação da arabinoxilana xilana-hidrolase, que clivaria a cadeia principal apenas na presença de uma ramificação com monômero de arabinose (Kovács, 2009).

Kumar e Wyman (2009) salientaram que na hidrólise da lignocelulose, as enzimas dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos também atuam sinergicamente. Os autores afirmam que com a adição de xilanases às enzimas celulásicas, a digestibilidade da celulose é inevitavelmente aumentada e acreditam que a razão para tal facilitação seja a remoção dos polissacarídeos hemicelulósicos e seus monômeros aumentando a acessibilidade à celulose.

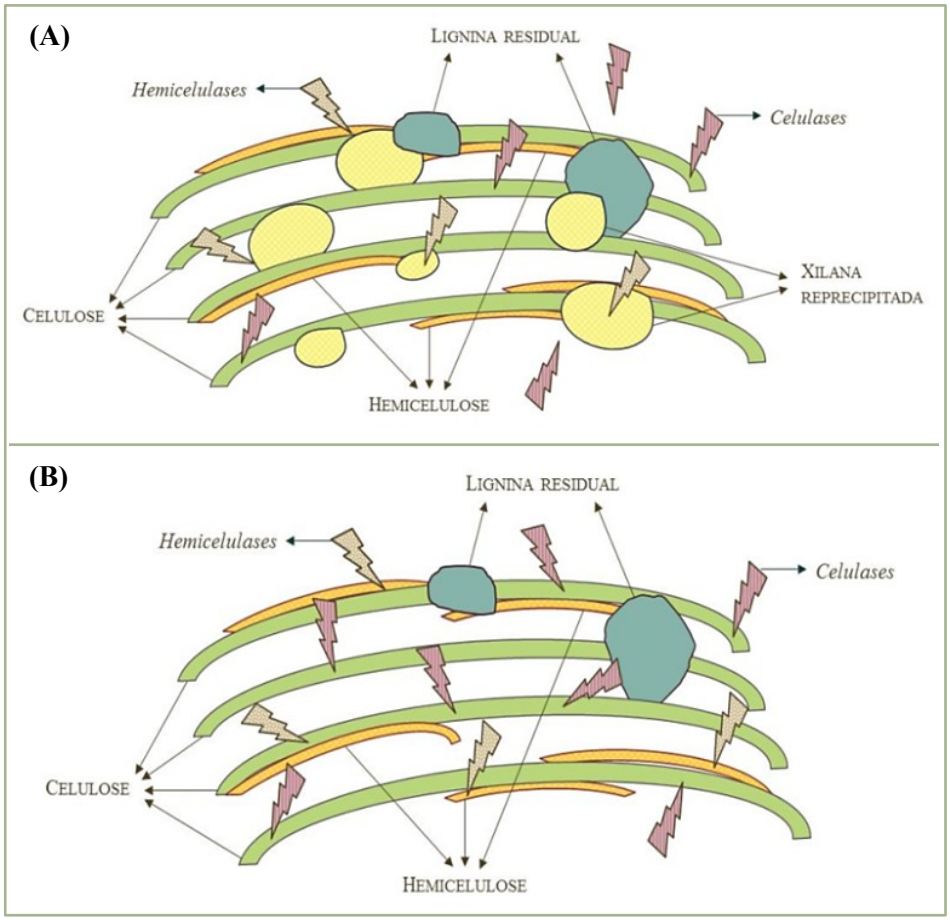
2.7.3 Sinergia entre celulases e hemicelulases

A complexidade da matriz lignocelulósica requer que diversas enzimas ajam em sinergia para que ocorra sua hidrólise. Como abordado anteriormente, o acesso à celulose é dificultado pela hemicelulose e pela lignina, sendo a lignina a maior barreira à degradação da celulose. A lignina pode ser removida por alguns pré-tratamentos específicos e a hemicelulose

se não removida por pré-tratamento, também pode ser convertida à açúcares fermentáveis por ação de biocatalisadores.

Kumar e Wyman (2009) afirmaram que a adição de xilanases a um coquetel enzimático para a degradação de celulignina parcialmente deslignificada – biomassa que passou por um processo de pré-tratamento alcalino, por exemplo –, aumenta a eficiência de hidrólise, uma vez que a liberação de glicose aumenta com a liberação de xilose. Os pesquisadores sugerem que essa liberação ocorra devido à liberação de açúcares residuais que reprecipitaram na matriz celulósica após o pré-tratamento da biomassa.

De fato, a remoção desta xilana reprecipitada aumenta a permeabilidade e acessibilidade de outros biocatalisadores à celulose. Na Figura 2.13 é possível observar que assim que as xilanas repreciptadas no meio são degradadas o acesso a celulose e a hemicelulose, remanecênte do pré-tratamento alcalino, torna-se mais facilitado, possibilitando a ação sinérgica das celulases e hemicelulases disponíveis no meio.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 2.13 Esquema de remoção da xilana reprecipitada. **(A)** matriz lignocelulósica pré-tratada alcalinamente (perde-se grande parte da lignina e há formação de xilana reprecipitada). **(B)** Hemicelulases capazes de degradar os açúcares reprecipitados, facilitando o acesso as celulases às fibras de celulose

2.8 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são substâncias químicas que apresentam em sua fórmula estrutural um átomo de hidrogênio positivamente polarizado. Na natureza esses ácidos podem ser encontrados em duas formas: com um átomo de oxigênio eletronegativo ligado a esse átomo de hidrogênio, formando uma ligação -OH, como o ácido acético; ou com um terminal -OH que mantem uma ligação com um átomo de carbono que também confere dupla ligação a um átomo de oxigênio, formando ligação -COOH (grupamento carboxila), que é o caso dos ácidos lático e succínico (McMurry, 2008).

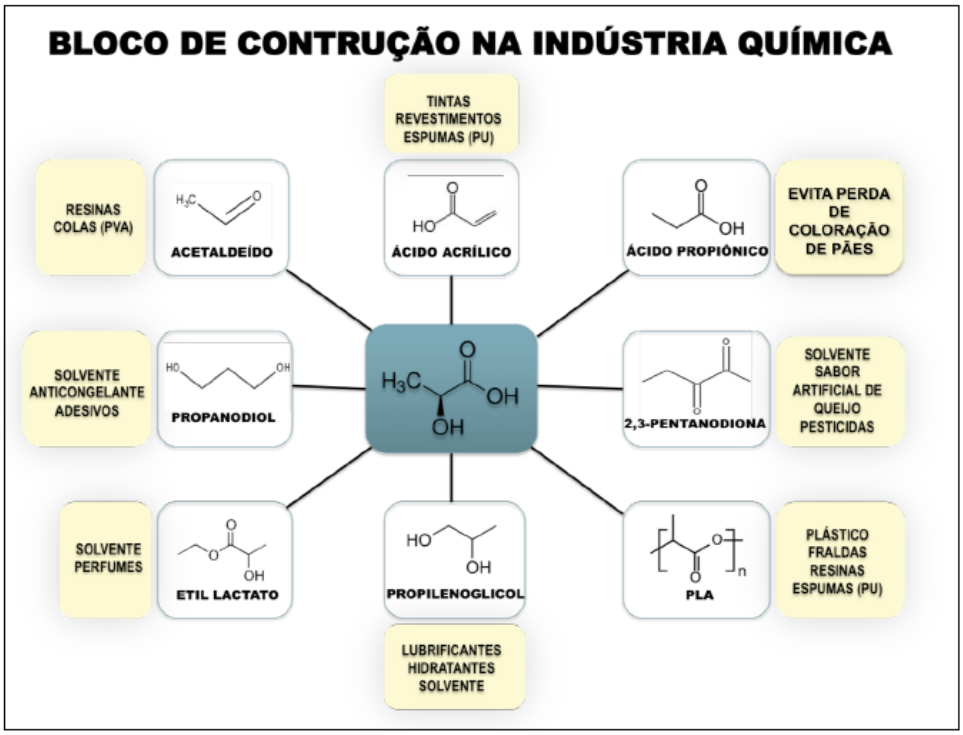
Em pesquisas mais recentes, um grupo particular de ácidos, em específico o ácido glicólico, está sendo empregado no tratamento contra envelhecimento cutâneo, uma vez que promove a escamação superficial da mesma e é capaz de ativar mecanismos biológicos que estimulam a renovação e o crescimento celular (Moraes, 2018). Outra aplicação de grande relevância é a utilização de certos ácidos, como por exemplo, o ácido lático como monômero na produção de polilactato, polímero utilizado na produção de plásticos biodegradáveis, próteses e suturas dado a facilidade de suas características naturais para biodegradação.

2.9 ÁCIDO LÁCTICO

2.9.1 Aplicações do ácido lático

O ácido lático constitui-se de uma *commoditie* com elevada aplicabilidade nas indústrias têxtil, farmacêutica, cosmética, química e alimentícia. Dentre estas, destaca-se a atuação na indústria alimentícia como acidulante, flavorizante, agente microbiano, estabilizador, umectante, emulsificante e plastificante (Vijayakumar *et al.,* 2008).

A presença dos grupos carboxílico e álcool contribui para a utilização do ácido lático como bloco de construção na geração de outras *commodities,* tais como o ácido acrílico, acetaldeído, propanodiol, etil lactato, propilenoglicol, polilactato, 2,3 pentadiona e o ácido propiônico (Benevenuti, 2016). A Figura 2.14 ilustra, de forma resumida, os produtos gerados a partir das *commodities* supracitadas, bem como algumas aplicações.



Fonte: Benevenuti, 2016.

Figura 2.14 Utilização do ácido lático como bloco de construção na indústria química

A demanda pelo ácido lático vem crescendo substancialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de atuação como monômero na produção do polilactato (PLA) (Wischral *et al.*, 2019), ilustrado na Figura 2.14. A pureza óptica do ácido lático apresenta destacada importância nas propriedades físico-químicas do PLA produzido. Os polímeros derivados dos ácidos D-lático e L-lático opticamente puros são materiais semi-cristalinos, enquanto os polímeros provenientes da mistura racêmica DL-lático são usualmente amorfos (Abdel-Rahman *et. al*, 2013). O PLA amorfo é usado, preferencialmente, em aplicações que demandem rigidez mecânica e o semi-cristalino destaca-se na aplicação como veículo medicamentoso.

2.9.2 Rotas tecnológicas de produção de ácido lático

O ácido lático pode ser produzido por rotas químicas e bioquímicas, e sua maior incidência na produção mundial realizada pela rota bioquímica, uma vez que a partir desta é possível produzir apenas um dos isômeros do ácido lático (Nolasco-Hipolito, 2002). A produção por síntese química gera como produto ambos os isômeros do ácido. E apresenta como maior vantagem à facilidade na etapa de purificação, uma vez que não há substrato residual misturado ao produto final.

2.9.2.1 Rota química para produção de ácido lático

A hidrólise da lactonitrila, a oxidação do propilenoglicol e a reação entre acetaldeído, H_2O e CO, são alguns exemplos de rota química para produção do ácido lático. Entre as três formas de produção citadas, apenas a hidrólise da lactonitrila, nitrocomposto utilizado como solvente é usado em escala industrial pela viabilidade de seu OPEX (Datta *et al.,* 1995).

Apesar de a lactonitrila produzir um produto com elevada pureza, a utilização da esterificação e da hidrólise como método de separação e purificação do ácido lático, leva à produção de uma solução com baixa concentração de ácido, aproximadamente 50% em peso (Datta *et al.,* 1995). Existe ainda o risco de o produto apresentar traços de metanol, utilizado na etapa de esterificação, o que inviabiliza a aplicação do ácido produzido para fins alimentícios (Kirk e Othmer, 1981).

2.9.2.2 Rota bioquímica para produção de ácido lático

Existem duas formas do ácido lático, o D(-) Dextrogiro e o L(+) Levógiro, ilustradas na Figura 2.15, e ambas pode ser obtidas durante a fermentação e variam de acordo com o gênero do microrganismo. Os gêneros de bactérias ácido-láticas de maior importância são *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus,* e *Bifidobacterium (*Klein *et al.,* 1998), sendo que os principais microrganismos empregados industrialmente para a produção do ácido láctico são do gênero *Lactobacillus* (Abdel-Rahman *et. al*, 2013).

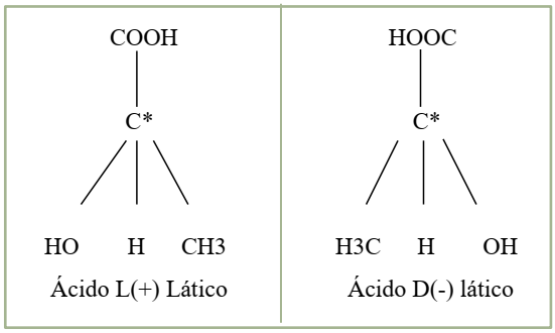


Figura 2.15 Fórmula estrutural dos isômeros quirais de ácido lático

A rota bioquímica para produção de ácido lático utiliza como principal agente fermentativo microrganismos que apresentam exigências nutricionais em aminoácidos e vitaminas para seu adequado crescimento e atividade fermentativa (Hugenholtz e Kleerebegem, 1999). A síntese de ATP (trifosfato de adenosina) não ocorre por meio de

respiração, tais microrganismos são capazes de obter energia através da fosforilação do substrato.

A fermentação conduzida por estes microrganismos podem ocorrer de duas formas dependendo da espécie envolvida e condições do meio. Desta forma, classificam-se como homofermentatívas ou homoláticas as bactérias capazes de produzir apenas ácido lático, sem interferência de outros produtos; e heterofermentativa ou heteroláticas quando ocorre simultaneamente a produção de ácido lático a obtenção de outros subprodutos, como o CO_2, etanol e/ou acetato, bem como a produção de ácidos mistos (Hofvendahl e Hagerdal, 2000 *apud* Li e Cui, 2010).

A via homolática é conhecida por via *Embden-Meyerhof*, onde 1mol de hexose se convertem em 2 mols de ácido lático e 2 mols de ATP. Nesta via, o metabolismo é caracterizado pela quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato (3C), que são posteriormente convertidas a lactato *(*Hofvendahl e Hägerdal, 2000 *apud* Li e Cui, 2010). Alguns autores afirmam que determinadas espécies desse grupo são capazes de fermentar pentoses através da via fosfato-pentose, onde se convertem 1 mol de pentose em 1,67 mol de ácido lático, entre elas *Enterococcus mundtii QU 25 e Lactobacillus plantarum* (Abdel-Rahman *et. al*, 2013).

Existem ainda microrganismos classificados como heterofermentativos facultativos, que apesar de realizarem a fermentação de forma similar aos homoláticos, produzem outros ácidos em condições limitantes de substrato. São capazes de converter pentose em ácido lático e acético via fosfocetolase indutível. Na presença de glicose, as enzimas da rota do fosfogluconato são inibidas. Algumas espécies heterofermentativas facultativas são: *L. alimentarius, L. plantarum, L. lactis, L. pentosus, L. xylosus (*Hofvendahl e Hägerdal, 2000 *apud* Li e Cui, 2010).

Já as bactérias classificadas como heterofermentativas utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a formação de ácido lático. As hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido lático, etanol e/ou acido acético, gás carbônico e ATP em condições de anaerobiose. Tais bactérias exercem a oxidação da glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, que sofre descarboxilação e ruptura da pentose resultando em duas moléculas de três (gliceraldeido-3-fosfato) e dois átomos de carbono (acetil-fosfato). O gliceraldeido-3-fosfato gera o lactato enquanto que o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos

distintos convertendo-se a etanol ou acetato. Algumas espécies de bactérias láticas heterofermentativa obrigatórias, são: *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum e L. reuteri (*Hofvendahl e Hägerdal, 2000 *apud* Li e Cui, 2010).

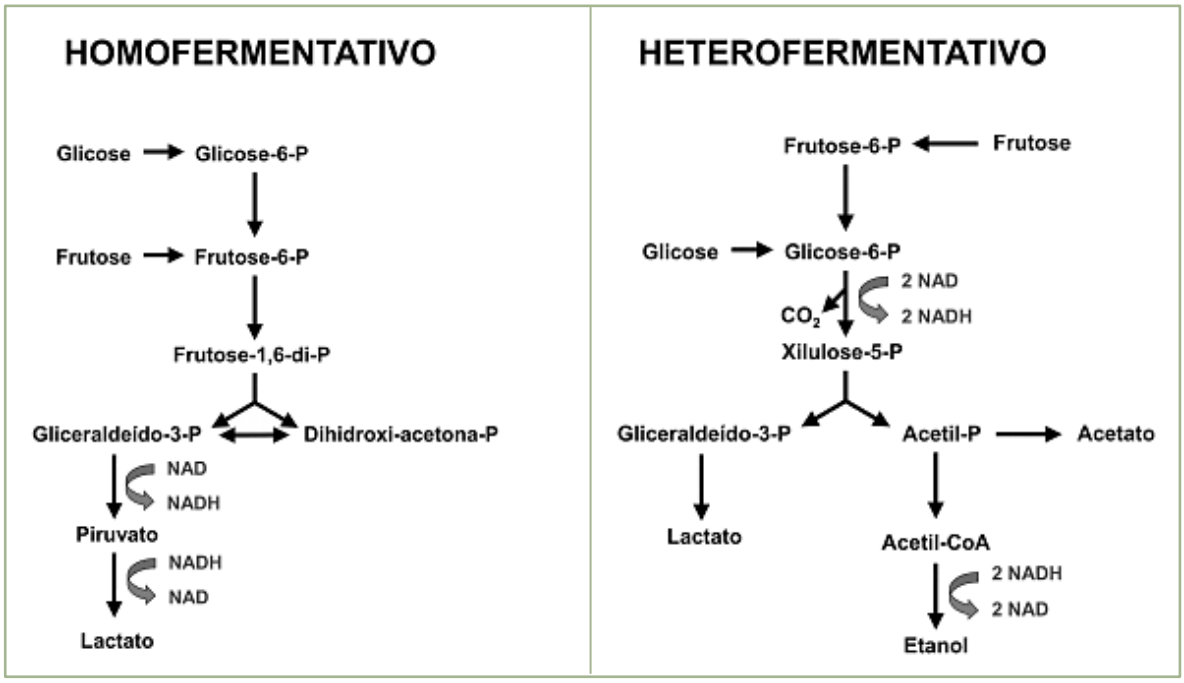
A linhagem empregada no presente estudo, *L. pentosus*, se caracteriza como heterofermentativa facultativa. A produção de ácido lático, realizada a partir das hexoses segue a rota de *Embden-Meyerhof*, e quando a partir das pentoses, é utilizada rota de fosfocetolase.

O Quadro 2.5 mostra resumidamente as suas principais rotas metabólicas usadas por bactérias ácido-láticas, enquanto a Figura 2.16 evidencia as duas etapas bioquímicas.

CARACTERIZAÇÃO	LAB HOMOFERMENTATIVAS	LAB HETEROFERMENTATIVAS
Produtos	Ácido Lático	Ácido lático, etanol, ácido acético, dióxido de carbono
Rotas metabólicas	Hexoses: *Embden-Meyerhof* Pentoses: Fosfato pentose	Hexoses: Fosfogluconato/fosfocetolase Pentoses: Fosfocetolase
Rendimento Teórico	Hexose: 1,0 g/g (2,0 mol/mol) Pentose: 1,0 g/g (1,67 mol/mol)	Hexose: 0,5 g/g (1,0 mol/mol) Pentose:0,6 g/g (1,0 mol/mol)
Gênero	*Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, Lactobacillus*	*Leuconostoc, Oenococcus, Lactobacillus*
Viabilidade comercial	Viabilidade por sua alta seletividade	Pouca viabilidade pela variedade de produtos

Fonte: Jaramillo (2014)

Quadro 2.5 Características principais das rotas metabólicas para bactérias ácido-láticas



Fonte: Gomes, 2009.

Figura 2.16 Rotas metabólicas simplificadas da fermentação das baterias ácido láticas, fermentação homofermentativa de glicose; fermentação heterofermentativa de glicose e pentoses

2.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O aumento da densidade populacional associado ao crescimento da demanda energética e as graves perturbações ambientais indicam a necessidade de mudança na matriz energética, uma vez que sua base é, em grande parte, derivada de fontes não renováveis. Atrelado a isto está a geração de resíduos agrícolas, que cresce consideravelmente nas últimas décadas, e a necessidade de aproveitamento desses materiais de matriz lignocelulósica capazes de gerar diversos produtos de alto valor agregado, dentre eles o ácido lático, por meio de procedimentos de pré-tratamentos para aumentar a acessibilidade da celulose ao ataque enzimático.

A biomassa lignocelulósica que mais se destaca no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. O crescimento da necessidade mundial por fontes de energias alternativas, aliado às condições climáticas favoráveis ao cultivo da cana-de-açúcar, tornou o país um importante fornecedor dessa biomassa vegetal para a exportação. O aproveitamento integral de biomassas como fonte renovável na produção de insumos, bioprodutos e energia torna-se uma alternativa coerente inserida no contexto de Biorrefinarias. É nessa grande temática que a presente dissertação de mestrado está inserida.

As diferentes concepções tecnológicas para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica incorpora a hidrólise enzimática de polissacarídeos da parede celular desses materiais. O processo de hidrólise se dá por meio de um consórcio de enzimas que atuam sinergicamente, podendo também haver anti-sinergismo nessa atuação, como inibição pelos produtos de hidrólise de determinada enzima na atuação de outra. A eficiente hidrólise enzimática, bem como o entendimento de como essas diferentes entidades enzimáticas atuam, é de fundamental importância para se definirem proporções ótimas desses biocatalisadores. A avaliação da fermentabilidade de hidrolisados enzimáticos é outro aspecto que necessita ser explorado, para assegurar a sustentabilidade econômica de processos que utilizam biomassa, em consonância com os conceitos e fundamentos da Bioeconomia.

Capítulo 3 – JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O complexo lignocelulósico é formado pela lignina, macromolécula formada basicamente por alcoóis aromáticos e que confere resistência ao material, mantendo a integridade da matriz; pela hemicelulose, um polissacarídeo composto principalmente por pentoses, que em gramíneas têm a xilose em sua maior porção e que é metabolizada por poucos microrganismos; e pela celulose, homopolissacarídeo composto por moléculas de glicose que podem ser fermentadas a diversos produtos de interesse comercial.

Para que a hidrólise deste material se torne viável, é preciso que o mesmo seja submetido a algum tipo de pré-tratamento. Estas técnicas tem o objetivo de fracionar as moléculas de lignina e/ou hemicelulose, na intenção de aumentar a acessibilidade e diminuir a recalcitrância da celulose possibilitando assim sua conversão bioquímica a algum produto de interesse.

Entretanto, apesar da maioria dos pré-tratamentos de biomassa ser capaz de superar a cristalinidade e solubilizar grande parte dos componentes do complexo lignocelulósico, algumas moléculas de hemicelulose tendem a reprecipitar sobre a matriz celulósica, diminuindo a disponibilidade de celulose para hidrólise. As xilanases são enzimas hidrolíticas que atuam nas ligações β-1,4 das xilanas sendo responsáveis pela hidrólise deste açúcar, e consequentemente, fracionam a porção hemicelulósica do complexo aumentando a proporção de celuloses disponíveis no meio.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Neste contexto, uma das propostas desta dissertação de mestrado foi utilizar xilanases como proteínas acessórias na hidrólise enzimática de material com matriz lignocelulósica, a fim de avaliar o sinergismo entre as hidrolases – xilanases e glucanases, na desconstrução do complexo lignocelulósicos. A outra vertente do trabalho se insere dentro de uma importante linha de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), que tange sobre a Engenharia de Produtos Enzimáticos e tem como principal objetivo a produção de coquetéis enzimáticos customizados para obtenção de altas eficiências de hidrólise da biomassa lignocelulósica e produção de xaropes ricos em açúcares fermentáveis a partir da mesma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

1. Investigar o sinergismo entre celulases e xilanases purificadas;
2. Avaliar o sinergismo entre xilanases purificadas e o coquetel enzimático comercial Celic® C-Tec2;
3. Avaliar o sinergismo entre xilanases purificadas e preparado enzimático produzido no LADEBIO;
4. Empregar técnica de planejamento experimental para otimização de coquetel enzimático formado por xilanases purificadas e o preparado LADEBIO;
5. Produzir hidrolisado rico em açúcares fermentáveis;
6. Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado produzido para a produção de ácido lático em biorreator descontínuo.

Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRÉ-TRATAMENTO DAS BIOMASSAS

4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Foi realizado no bagaço de cana de açúcar um pré-tratamento alcalino, com a finalidade de se reduzir o teor de lignina do material e facilitar o acesso enzimático às fibras celulósicas e hemiceluloses.

Adicionou-se uma solução de NaOH 2% m/v, com relação sólido:líquido de 1:20 (g:mL), a 121ºC por 30 minutos, método otimizado por Vásquez (2007). Após o processo foram obtidas duas frações: uma líquida, sendo a lignina seu componente majoritário e uma sólida, denominada de celulignina alcalina parcialmente deslignificada – CAPD. A separação das fases foi realizada com a mistura ainda quente, utilizando um filtro. O sólido obtido foi lavado abundantemente com água destilada até todo o excesso de lignina ser removido e colocado em uma estufa de circulação a 50ºC para secar.

Após a etapa de secagem, a biomassa foi cominuída em moinho (MF10 Basic, marca IKA®) e seu tamanho padronizado por uma peneira de 1mm de abertura. A Figura 4.1 mostra o aspecto do bagaço *in natura* e após o pré-tratamento descrito.

Figura 4.1 Bagaço de cana-de-açúcar, antes e após maceração em moinho e pré-tratamento alcalino proposto

4.1.2 Polpa celulósica

A polpa celulósica utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela empresa FIBRIA/Aracruz Celulose e Papel, situada no Espirito Santo. Esta polpa é proveniente do sistema de decantação que é a última etapa por onde o material passa antes de ser descartado, ou seja, foi submetida a todos os tratamentos descritos no tópico 2.2.1.1 da presente dissertação. Desta forma é possível afirmar que a biomassa passou pelos processos de picagem, cozimento, depuração, deslignificação por O_2 e posterior branqueamento.

Ao chegar ao LADEBIO, a biomassa foi cominuída em moinho (MF10 Basic, marca IKA®) e seu tamanho padronizado por uma peneira de 1mm de abertura. A Figura 4.2 mostra o aspecto da polpa celulósica logo que chegou ao laboratório, e após o processamento da biomassa no moinho.

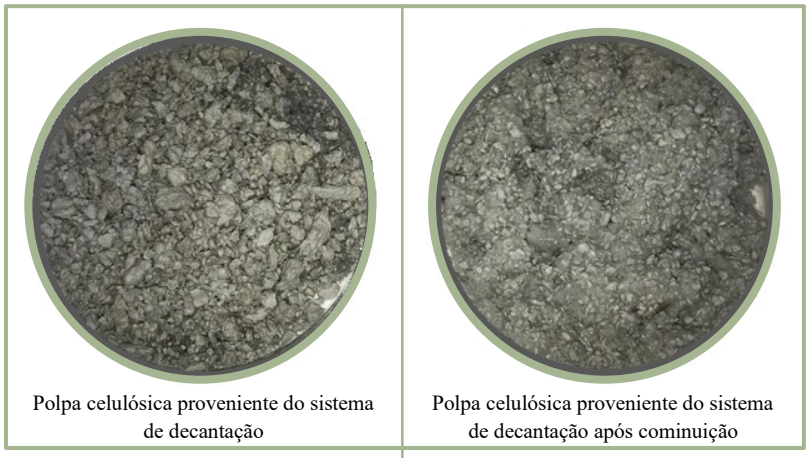


Figura 4.2 Polpa celulósica após sair do processo de decantação, e após processamento em moinho microfino

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS

As três biomassas, polpa celulósica, bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e CAPD, foram caracterizadas segundo procedimento descrito por Sluiter *et al.* (2005) e Ververis *et al.* (2007). Cadinhos do tipo Gooch nº3 foram previamente calcinados na mufla a 575°C por 5 horas, pesados (W0) e armazenados em dessecador. O ensaio foi realizado em triplicata, onde 0,3g de amostra foram devidamente pesadas em erlenmeyers de 250ml e adicionados 3,0mL de H_2SO_4 72%, mantendo os frascos a temperatura de 30°C por uma hora.

Após esse período, adicionou-se aos frascos 84,0mL de H_2O deionizada, diluindo o ácido a 4,0%. Os frascos foram autoclavados por uma hora a 121°C. Os hidrolisados foram filtrados nos cadinhos calcinados, lavando o resíduo com água destilada para remover todo o hidrolisado. Os resíduos sólidos foram secos a 100°C por 24 horas e os cadinhos novamente pesados (W1). Após a pesagem W1, os cadinhos foram calcinados em mufla a 550°C por cinco horas, resfriados e pesados (W2).

Os hidrolisados foram então neutralizados com $Ca(OH)_2$ para pH entre 5,5 e 6,0, filtrados em papel filtro, com auxílio de funil de büchner e avolumados para 200mL com água deionizada. Foram então mensuradas as concentrações de açúcares redutores totais (C2) pelo método de DNS e glicose (C1) pelo método de enzimático de glicose oxidase (GOD). Os teores de glucana, xilana e lignina foram calculados pelas Equações 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4:

$$Glucanas\left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{0,9}{0,96}\right) \times C1 \times \left(\frac{v}{m}\right) \times \alpha \times 100 \qquad \textbf{(Equação 4.1)}$$

Onde:

0,90 = Proporção estequiométrica mássica
0,96 = rendimento de sacarificação
C1 = concentração de glicose (g/L)
v = volume total da solução de açúcar (L)
m = massa da amostra seca (g)
α= diluição da amostra (se houver)

$$Xilanas\left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{0{,}88}{0{,}93}\right) \times (C2 - C1) \times \left(\frac{v}{m}\right) \times \alpha \times 100 \qquad \textbf{(Equação 4.2)}$$

Onde,

0,88 = Proporção estequiométrica mássica
0,93 = rendimento de sacarificação
C1 = concentração de glicose (g/L)
C2 = concentração de açúcares redutores (g/L)
v = volume total da solução de açúcar (L)
m = massa da amostra seca (g)
α = diluição da amostra (se houver)

$$Lignina\left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{W1-W2}{m}\right) \times 100 \qquad \textbf{(Equação 4.3)}$$

Onde,

W1 = massa do resíduo seco da filtragem (g)
W2 = massa do resíduo após calcinação (g)
m = massa da amostra seca (g)

$$Cinzas\left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{W2-W0}{m}\right) \times 100 \qquad \textbf{(Equação 4.4)}$$

Onde,

W0 = massa do cadinho vazio (g)
W2 = massa do resíduo após calcinação (g)
m = massa da amostra seca (g)

4.3 Procedimentos analíticos

No presente trabalho foram utilizadas quatro enzimas diferentes: Celulase purificada de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich®); Xilanase purificada de *A. oryzae* (Sigma-Aldrich®); um preparado enzimático produzido no LADEBIO a partir de *Penicillium funiculosum* (Passos, 2018); e o coquetel enzimático Celic® C-Tec2 (Novozymes). Todas as atividades enzimáticas foram quantificadas, tanto as atividades celulásicas (FPase, CMCase,

Avicelásica, β-glucosidásica) quanto a xilanásica, bem como a concentração de proteínas totais, obtidas a partir da metodologia de Bradford (1976).

Os protocolos utilizados se embasam em adaptações de Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al.* (2009), que tem como premissa a determinação, por espectrofotometria, a intensidade de cor formada, relacionada a cada reagente específico usado. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais (UI), sendo que uma unidade de atividade equivale a liberação de 1μmol de produto respectivo por minuto. As análises de açúcares totais e específicos, bem como a avaliação da produção de ácido lático na fermentação, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.3.1 Preparo reagente DNS e tampão citrato de sódio

O reagente DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico) é o que reage mudando a coloração das amostras de acordo com a quantidade de açúcar liberada no meio reacional. Este reagente foi preparado com as proporções apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Componentes do reagente DNS

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6g
NaOH	19,8g
Sal de Rochele	306g
Fenol	7,6mL
Metabissulfito de sódio	8,3g
Água destilada	1416mL

Fonte: Miller (1959)

O ácido 3,5-dinitrosalicílico e o NaOH foram dissolvidos previamente em água. Os demais componentes foram adicionados em seguida. A solução foi armazenada em ausência de luz por 24 horas e, após este período, filtrada em papel de filtro.

O tampão citrato de sódio 0,05M foi preparado a partir da mistura de duas soluções, uma de ácido cítrico 0,1M e a outra de citrato de sódio 0,1M. Para preparar 1,0L deste tampão, são misturados 205mL da solução de ácido cítrico 0,1M, 295mL da solução de citrato de sódio 0,1M e 500mL de água destilada. O pH foi ajustado para 5,0 com a adição das soluções de citrato de sódio ou ácido cítrico, para aumentar ou diminuir o pH, respectivamente.

4.3.2 Quantificação da atividade enzimática em papel de filtro (FPásica)

A metodologia para quantificação da atividade FPásica das enzimas estudadas foram adaptadas a partir dos estudos de Ghose (1987). Essa quantificação indica a atividade sinérgica entre as endocelulases e exocelulases presentes nos coquetéis enzimáticos estudados, e para tal, utiliza-se como substrato o papel filtro. As análises foram realizadas em triplicata, sendo necessária a utilização de três microtubos de 2mL por amostras, um frasco para controle de enzima, um frasco de controle de substrato e um branco reacional. Um círculo, com 0,5cm de diâmetro, de filtro de papel foi adicionado a cada um dos microtubos contendo as triplicatas e uma também ao frasco de controle de substrato.

Para análise da atividade, foram adicionados 40,0µL de tampão citrato de sódio 0,05M e 20,0µL da enzima estudada às triplicatas e ao frasco de controle enzimático. Nos microtubos de controle de substrato e o branco reacional foram adicionados apenas o tampão citrato de sódio 0,05M (60,0µL). Os microtubos foram incubados em banho quente por 1 hora a 50ºC. Após o intervalo de reação foram imersos em banho fervente por 5 minutos, a fim de interromper as atividades enzimáticas.

Em seguida, adicionou-se 120,0µL de reagente DNS a todos os microtubos, e os mesmos foram novamente incubados por 5 minutos em banho fervente para o processo de reação do DNS. Após, cada um dos microtubos tiveram acrescidos a seu volume reacional, 800,0µL de água destilada para posterior homogeneização. Os microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional foram feitos buscando a exclusão de interferências nas leituras de absorbância dos microtubos analisados. Utilizou-se o frasco com branco reacional para calibrar o espectrofotômetro a 540nm e em seguida, as absorbâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registradas. A Figura 4.3 exibe um esquema do processo. Para o cálculo da glicose liberada na reação é utilizada a Equação 4.5 e para o cálculo da atividade enzimática obtida aplica-se a Equação 4.6:

$$Glicose(g/L) = \frac{[(Abs_x - Abs_{CE} - Abs_{CS}) - Coef\ Linear]}{Coef\ Angular} \qquad \textbf{(Equação 4.5)}$$

Onde,

Abs_x = absorbância amostra (nm)
Abs_{CE} = absorbância controle de enzima (nm)
Abs_{CS} = absorbância controle de substrato (nm)
Coeficiente angular e linear = obtidos pela curva padrão

$$Ativ.Enz.(U/mL) = \frac{(Glicose * V_R * F_D)}{180 * T * V_E} \quad \textbf{(Equação 4.6)}$$

Onde,

Glicose = obtida na reação (g/L)
V_R = volume reacional total (mL)
F_D = fator de diluição da amostra
180 = massa molecular glicose (g/mol)
T = tempo reacional (min)
V_E = volume de enzima diluída na reação

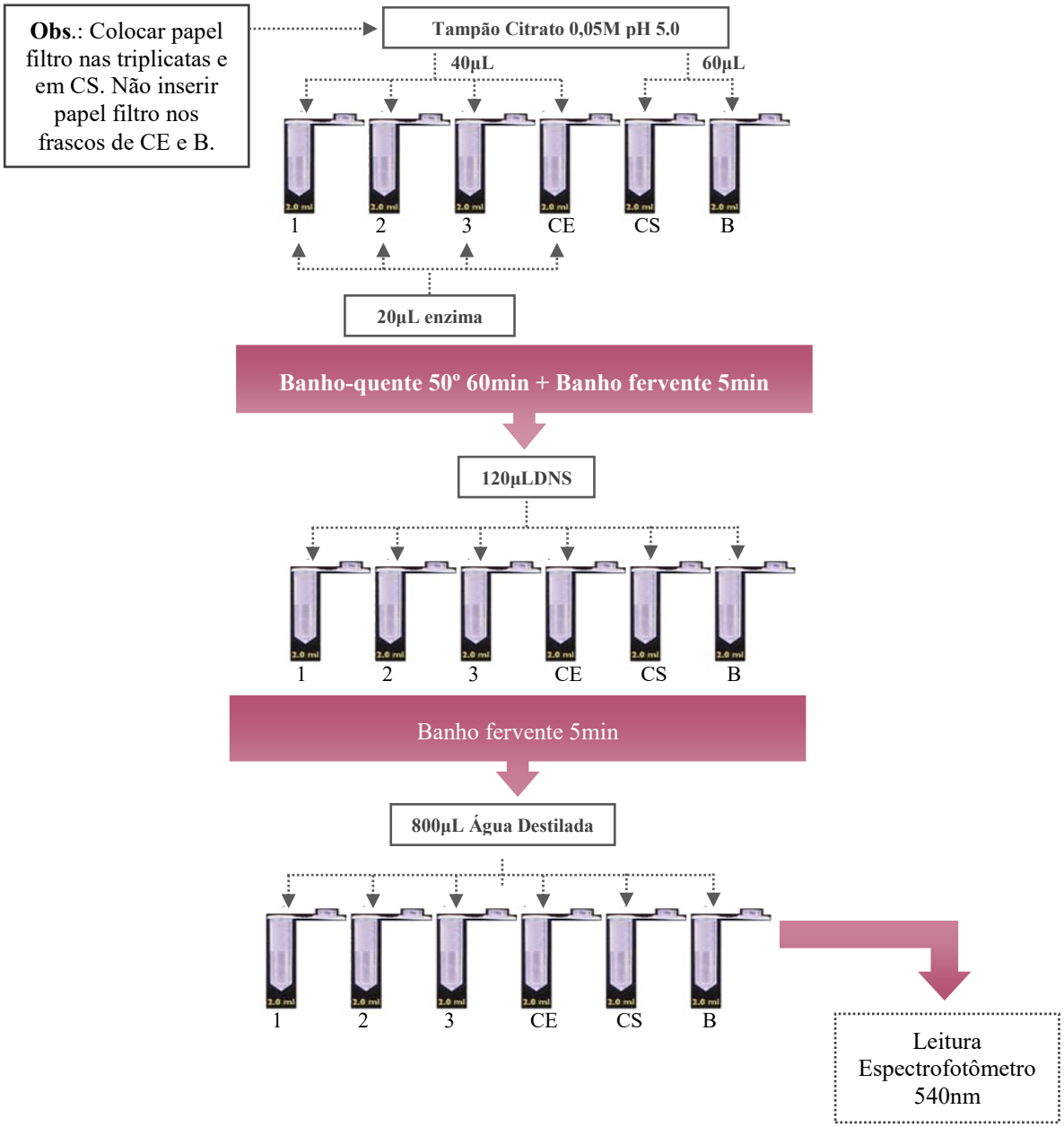


Figura 4.3 Esquema simplificado da análise quantitativa de atividade enzimática de FPase

4.3.3 Quantificação da atividade enzimática avicelásica

A metodologia para quantificação da atividade avicelásica das enzimas estudadas foram adaptadas a partir dos estudos de Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al.* (2009). Tal quantificação é capaz de indicar a atividade enzimática do grupo das exoglucanases, composto pelas glucano-hidrolases e o das celobiohidrolases, sendo as primeiras responsáveis pela liberação direta de moléculas de glicose, e as demais pela hidrólise primária das fibras celulósicas e sendo responsáveis pela amorfogênese e ruptura física do substrato, com o aumento das regiões intersticiais e originando dímeros de glicose, celobiose.

As análises foram realizadas em microtubos de 2,0mL e adicionados 50µL de enzima devidamente diluída em tampão de citrato de sódio 0,05M, e 50µL de solução Avicell® 2% m/v (20g/L) como substrato. A mistura foi incubada a 50ºC por 15 minutos e depois levada ao banho fervente por 5 minutos para interromper as atividades enzimáticas. Então, 300µL de reagente DNS foram adicionados aos microtubos, os quais foram levados ao banho fervente por 5 minutos. No fim desta reação, 1,5mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram realizados para exclusão de suas interferências nas leituras das absorbâncias dos microtubos experimentais. Todas as análises foram feitas em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540nm e depois, as absorbâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados. As Figuras 4.4(a) e 4.4(b) mostra um esquema simplificado da análise. Para o cálculo da glicose liberada na reação é utilizada a Equação 4.5 anteriormente citada e para o cálculo da atividade enzimática obtida aplica-se a Equação 4.6.

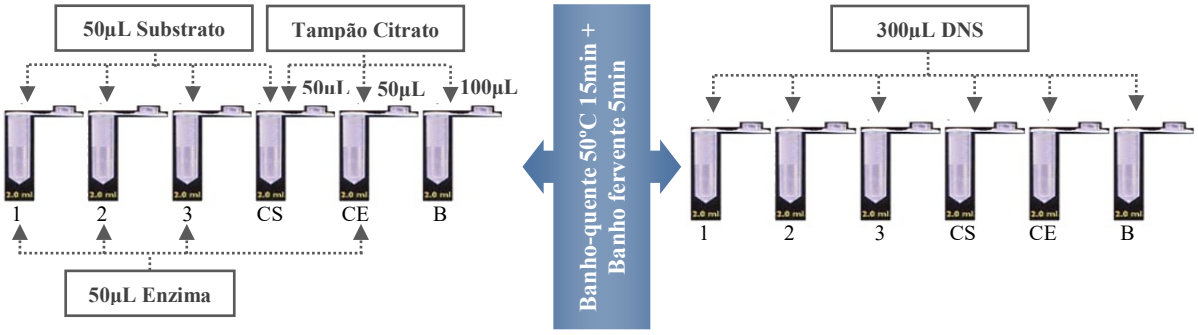


Figura 4.4(a) Esquema simplificado (fase inicial) da análise das atividades enzimáticas avicelásica, CMCásica e xilanásica

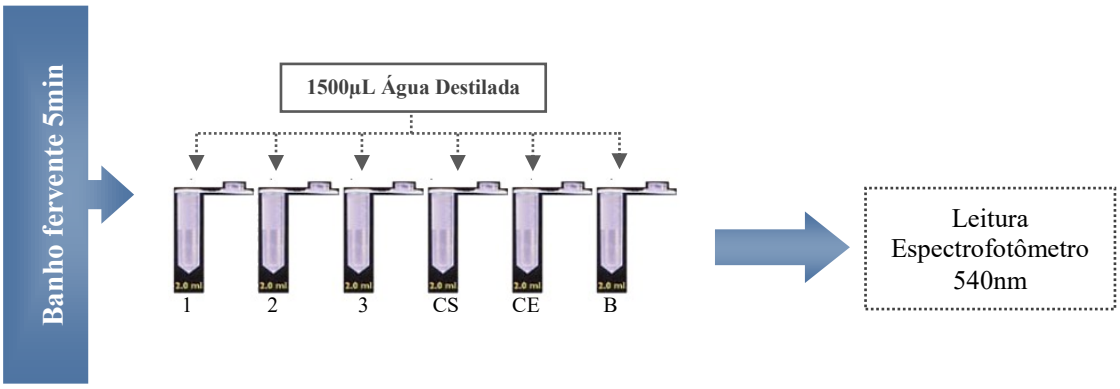


Figura 4.4(b) Continuação Figura 4.4(a). Esquema simplificado (fase final) da análise das atividades enzimáticas avicelásica, CMCásica e xilanásica

4.3.4 Quantificação da atividade enzimática CMCásica

A metodologia para quantificação da atividade CMCásica das enzimas estudadas foram realizadas a partir de adaptação dos estudos de Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al.* (2009). A quantificação das atividades em carboximetilcelulose (CMC) aponta a atividade de enzimas endoglucanásicas, responsáveis por atuar, com maior incidência, nas regiões internas da estrutura amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos de tamanhos menores.

O processo é similar ao anterior, divergindo-se apenas no substrato de reação utilizado. Em microtubos de 2,0mL foram adicionados 50µL de enzima devidamente diluída em tampão de citrato de sódio 0,05M e pH 5,0, e 50µL de solução de CMC 2% m/v (20g/L) como substrato. Os microtubos foram incubados, por 15 minutos, a 50ºC e, em seguida, levados ao banho fervente por 5 minutos. Após esse intervalo, 300µL de reagente DNS foram adicionados e os microtubos foram levados novamente ao banho fervente por 5 minutos. Ao fim do tempo reacional, 1,5mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Os controles de enzima e substrato, e o branco reacional também foram feitos para excluir as suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540nm e depois as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

Os cálculos realizados para quantificar a liberação de glicose e quantificação da atividade enzimática a partir deste substrato estão explicitados nas Equações 4.5 e 4.6,

respectivamente. O esquema representado na Figura 4.4(a) e 4.4(b) também esclarece esta análise, uma vez que todo o procedimento é análogo à quantificação de atividade avicelásica, diferindo apenas ao substrato de reação.

4.3.5 Quantificação da atividade β-glucosidásica

Outra quantificação enzimática realizada foi a das β-glucosidases que capazes de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) gerando unidades de glicose livres. A metodologia para quantificação da atividade β-glucosidásica das enzimas estudadas foram realizadas a partir de adaptação dos estudos de Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al.* (2009).

Em microtubos de 2,0mL foram adicionados 50µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 0,05M e pH 5,0, e 50µL de solução de celobiose 2% m/v (20g/L). Durante 15 minutos, a mistura foi incubada a 50ºC e depois levada ao banho fervente por 5 minutos. Após este intervalo de tempo, utilizou-se o *kit* glicose oxidase (GOD) para quantificar a glicose liberada pelo método da glicose oxidase. Após a adição do reagente do *kit*, os microtubos foram incubados a 37ºC por 10 minutos. Ao fim deste intervalo, 1,0mL de água destilada foi adicionado, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato, padrão do *kit* e branco reacional também foram feitos para exclusão de suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 505nm e depois, as absorvâncias dos demais microtubos foram registrados.

Para o cálculo da glicose liberada na reação é utilizada a Equação 4.7 e para o cálculo da atividade enzimática obtida aplica-se a Equação 4.8:

$$Glicose(g/L) = \frac{Abs_y}{Abs_p} \qquad \textbf{(Equação 4.7)}$$

Onde,

Abs_x = absorbância amostra (nm)
Abs_p = absorbância padrão (nm)

$$Ativ.Enz.(U/mL) = \frac{(Glicose * V_R * F_D)}{180 * T * V_E * F_c} \quad \textbf{(Equação 4.8)}$$

Onde,

Glicose = obtida na reação (g/L)
V_R = volume reacional total (mL)
F_D = fator de diluição da amostra
180 = massa molecular glicose (g/mol)
T = tempo reacional (min)
V_E = volume de enzima diluída na reação
F_C = fator de correção GOD

4.3.6 Quantificação da atividade endo-xilanásica

A quantificação das atividades em xilana aponta a atividade de enzimas do grupo das xilanases, responsáveis pela biocatalização das xilanas, gerando oligômeros de β-D-xilopiranosilo e outros sacarídeos precursores de xilose, bem como a própria molécula livre.

A análise é semelhante às de quantificação de atividades avicelásicas e CMCásicas, diferindo apenas no substrato reacional. Em microtubos de 2,0mL foram adicionados 50µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 50mM e pH 5,0, e 50µL de solução de xilana 2% m/v (20g/L). Os microtubos foram incubados, durante 15 minutos, a 50ºC e, logo em seguida, levados ao banho a 100ºC por 5 minutos. Adicionaram-se, então, 300µL de reagente DNS e os microtubos foram novamente incubados em banho fervente por 5 minutos. Ao fim da reação, 1,5mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram feitos para exclusão de suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540 nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

Os cálculos para quantificação da liberação de glicose e quantificação da atividade enzimática, quando utilizando a xilana como substrato, são determinados a partir das Equações 4.5 e 4.6, respectivamente. O esquema representado na Figura 4.4(a) e 4.4(b) também elucida esta análise, uma vez que todo o procedimento é análogo à quantificação de atividade avicelásica, diferindo apenas ao substrato de reação.

4.3.7 Quantificação da concentração de proteínas pelo método de *Bradford*

Uma curva padrão foi construída a partir de uma solução de albumina bovina sérica (BSA) com concentrações variando de 50 a 1000mg/L. Para a quantificação de proteínas, foi aplicada a metodologia de Bradford (1976). Utilizaram-se microtubos de 2,0mL aonde 20µL de amostra (água para o branco), devidamente diluída em água destilada, foram adicionadas a 1000µL de reagente Bradford (BioRad). As análises foram feitas em triplicata e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorvância dos microtubos foi lida em 595nm, calibrando-se a sua leitura com o branco experimental. Os cálculos para quantificação da concentração de proteínas totais são determinados a partir da Equação 4.9.

$$PTN\ (g/L) = \frac{(\ Abs_z - Coef\ Linear)}{Coef\ Angular} * \ F_D \qquad \textbf{(Equação 4.9)}$$

Onde,

Abs_z = absorbância amostra (nm)
Coeficiente angular e linear = obtidos pela curva padrão
F_D = fator de diluição

4.3.8 Quantificações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para quantificação dos açúcares totais, glicose e xilose foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo '*Waters*' (Sistema de bombeamento modelo 510, injetor Rheodyne, detector de índice de refração modelo 410), coluna HiPlex H – Agilent. Utilizou-se como fase móvel H_2SO_4 5,0mM, a um fluxo de 0,6mL/min, e temperaturas de forno de 60ºC e detector de 50ºC. Como padrão foi utilizado celobiose, glicose, xilose e arabinose. Para quantificar o ácido lático foi utilizada a mesma coluna e condições de análise de açúcares com detector ultravioleta na faixa de 254nm.

4.3.9 Cálculo de Eficiência de Hidrólise

A eficiência de hidrólise em glicose foi calculada através da Equação 4.10:

$$EH(\%) = \left(\frac{GLH}{GT \times 1.11}\right) \times 100 \qquad \textbf{(Equação 4.10)}$$

Onde,

E.H.: eficiência da hidrólise enzimática (%);
GLH: concentração de glicose (g/L) liberada após hidrólise enzimática;

GT: concentração de glicose (g/L) que poderia ser obtida com eficiência de 100% (glicose teórica);
1.11: fator de ajuste considerando a adição de uma molécula da água (18g/mol) para a liberação de uma molécula de glicose (180g/mol), após o rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise da celulose.

4.3.10 Cálculo para estudo do efeito sinérgico da adição de xilanases aos meios reacionais

O grau de sinergismo pode ser calculado pela Equação 4.11, descrita abaixo:

$$GS = \frac{ART_{XIL+CEL}}{ART_{XIL}+ART_{CEL}} \qquad \textbf{(Equação 4.11)}$$

Onde,

GS: grau de sinergismo;
$ART_{XIL+CEL}$: concentração de glicose (g/L) liberada após hidrólise enzimática no experimento com adição de xilanases;
ART_{XIL}: concentração de glicose (g/L) liberada após hidrólise enzimática quando utilizada somente xilanase.
ART_{CEL}: concentração de glicose (g/L) liberada após hidrólise enzimática quando utilizada somente celulase.

A obtenção de um grau de sinergismo superior a 1,0 indica que suplementar o meio reacional auxilia positivamente na hidrólise e quanto maior for de 1,0, consequentemente maior também será a liberação de glicose.

4.4 Escolha de biomassa e Análise de sinergismo entre celulases e xilanases

Para análise e escolha da biomassa a ser utilizada em todo processo foi realizado um experimento em microtubos de 2,0mL com volume reacional final de 1,0mL e teor de sólidos de 1,0% (m/v). Foram realizados três controles: controles de substratos, utilizando apenas tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5,0 e as biomassas estudadas; e controles de ambas as enzimas em ambas as biomassas, onde a carga proteica foi da razão de 10mg/$g_{celulose}$ diluída em tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5,0; as seis hidrólises controle rodaram por 24 horas, os microtubos foram então centrifugados e o sobrenadante analisado em HPLC.

Para avaliação do efeito sinérgico entre a celulase purificada e a xilanase, foi realizado um ensaio em paralelo, também em microtubos de 2,0mL com volume reacional

final de 1,0mL e teor de sólidos de 1,0% (m/v). Primeiramente, foi feito um pré-tratamento das biomassas com a xilanase, por 24 horas e carga protéica de $10mg_{proteína}/g_{celulose}$ em tampão citrato de sódio 0,05M. Ao fim do período de reação, os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante analisado em HPLC. A biomassa presente nos microtubos encaminhadas para secar em estufa a 50ºC por 24 horas. Após o processo de secagem, foram adicionadas $10mg_{proteína}/g_{celulose}$ de celulase e $10mg_{proteína}/g_{celulose}$ de xilanase; essa hidrólise perdurou também por 24 horas. Os microtubos foram centrifugados e os sobrenadantes analisados em HPLC. Todos os ensaios aqui descritos foram realizados a temperatura de 50ºC e agitação de 200rpm.

Em resumo, foram realizados:

1. S: controle substrato
2. A: controle $celulase_{24h}$
3. B: controle $xilanase_{24h}$
4. AB: $xilanase_{24h} \xrightarrow{\text{centrifugação+secagem}} (xilanase + celulase)_{24h}$

Com os dados deste ensaio foi possível realizar o primeiro estudo sinérgico, com os valores obtidos a partir da hidrólise da celulase pura no sistema reacional, bem como da xilanase, e o ensaio utilizando a xilanase como suplementação à celulase, a fim de facilitar a atuação da mesma sobre a celulignina. Desta forma, o cálculo utilizado foi o da Equação 4.12:

$$GS = \frac{AB}{A+B} \qquad \textbf{(Equação 4.12)}$$

Onde,

A: controle celulase $_{(24h)}$ – $10mg/g_{celulose}$
B: controle xilanase $_{(24h)}$ – $10mg/g_{celulose}$
AB: xilanase + celulase $_{(24h)}$ – $20mg/g_{celulose}$

4.5 Ensaios de pré-tratamento enzimático utilizando diferentes coquetéis para hidrólise

O objetivo deste ensaio foi avaliar outras possibilidades de sinergismo entre a xilanase purificada e outros coquetéis enzimáticos. Os coquetéis avaliados foram um preparado LADEBIO, oriundo de *Penicillium funiculosum*, e o outro foi o Celic® C-Tec2.

Estes ensaios foram realizados com CAPD, em microtubos de 2,0mL com volume reacional final de 1,0mL. Para os ensaios realizados com a Celulase da Sigma® e o preparado LADEBIO, foi utilizado teor de sólidos de 2,5% e carga protéica de $10mg_{proteína}/g_{celulose}$,

enquanto para o coquetel da Celic® C-Tec2, o teor de sólidos foi de 20% e carga de proteínas de 20mg/g. Assim como no ensaio anterior, as enzimas foram diluída em tampão citrato de sódio 5,0mM, pH 5,0; as hidrólises correram por 24 horas, a temperatura de 50ºC e agitação de 200 rpm. Ao fim das reações os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante analisado em HPLC.

4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA REACIONAL

Para obtenção de um sistema otimizado visando como resposta a eficiência hidrolítica e a produção de glicose, utilizou-se a técnica estatística de planejamento experimental *delineamento composto central rotacional* (DCCR). O planejamento foi realizado utilizando o preparado enzimático LADEBIO e a xilanase purificada da Sigma®. A técnica foi aplicada com adição de pontos axiais e ponto central, considerando como variáveis independentes o teor de sólidos, a carga de celulases e a carga de xilanases; e variáveis dependentes a eficiência de hidrólise e a produção de glicose. A tabela 4.2 mostram as variáveis independentes e os níveis e valores reais utilizados neste experimento e a tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento experimental.

Tabela 4.2 Variáveis independentes, seus níveis e valores reais

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	NÍVEIS CODIFICADOS E VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES				
	-1.68	**-1**	**0**	**+1**	**+1.68**
Teor de sólidos (%)	1.59	5.0	10.0	15.0	18.41
Carga de celulase (mg/g)	6.6	10	15	20	23.4
Carga de xilanase (mg/g)	6.6	10	15	20	23.4

Tabela 4.3 Matriz do planejamento experimental

EXPERIMENTO	TEOR DE SÓLIDOS (%)	CARGA DE CELULASE (mg/g)	CARGA DE XILANASE (mg/g)
01	5,0	10,0	10,0
02	5,0	10,0	20,0
03	5,0	20,0	10,0
04	5,0	20,0	20,0
05	15,0	10,0	10,0
06	15,0	10,0	20,0
07	15,0	20,0	10,0
08	15,0	20,0	20,0

EXPERIMENTO	TEOR DE SÓLIDOS (%)	CARGA DE CELULASE (mg/g)	CARGA DE XILANASE (mg/g)
09	1,59	15,0	15,0
10	18,41	15,0	15,0
11	10,0	6,59	15,0
12	10,0	23,41	15,0
13	10,0	15,0	6,59
14	10,0	15,0	23,41
15 (C)	10,0	15,0	15,0
16 (C)	10,0	15,0	15,0
17 (C)	10,0	15,0	15,0

C: pontos centrais

O *software Statistica*® 8.0 foi utilizado para criar o desenho experimental, analisar os resultados e gerar o modelo matemático do sistema, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Foram realizados 17 experimentos de hidrólise em CAPD, com diferentes proporções dos extratos enzimáticos, em microtubos de 2,0mL, com volume reacional final de 1,0mL cada. Bem como nos ensaios anteriores, as enzimas foram diluídas em tampão citrato de sódio 5,0mM, pH 5,0; as hidrólises correram por 24 horas, a temperatura de 50ºC e agitação de 200rpm. Ao fim das reações os microtubos foram centrifugados e os sobrenadantes analisados em HPLC.

Para a validação da condição ótima fornecida pelo *software*, a função "*Desirability"* do mesmo foi utilizada e os resultados obtidos comparados aos valores preditos gerados pela função. Este experimento de hidrólise foi conduzido em quadruplicata nas mesmas condições que as utilizadas para gerar o modelo matemático.

4.7 PRODUÇÃO DE HIDROLISADO CONCENTRADO E CURVA CINÉTICA DE EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA

A produção do hidrolisado foi realizada em frasco Erlenmeyer de 1000 mL, com volume reacional final de 230 mL. As condições para o experimento foram as mesmas obtidas no ensaio de validação (12,8% de teor de sólidos, 6,6$mg_{proteína}/gc_{elulose}$ de xilanase e 23,4$mg_{proteína}$ /$g_{celulase}$ do extrato LADEBIO). O frasco foi incubado a 50ºC, sob agitação de 200rpm por 32 horas. Ao fim do tempo de reação, o líquido e a fração não hidrolisada da biomassa foram filtrados em papel filtro, em ambiente estéril; o concentrado obtido foi armazenado em freezer a -20ºC até o momento de inocular o biorreator de fermentação.

Para confecção da curva cinética de eficiência hidrolítica, foram retirados oito pontos de 1,0mL – o ponto 0 e mais sete pontos a cada quatro horas decorridas de experimento. Os valores referentes ao último ponto retirado foram comparados aos resultados da validação experimental, assim como dos resultados preditos pelo *software* no intervalo de confiança de 95%.

4.8 FERMENTAÇÃO LÁTICA DO HIDROLISADO PRODUZIDO

A fermentação do hidrolisado obtido a partir da CAPD, utilizando o preparado enzimático LADEBIO suplementado com a proporção ideal de xilanase purificada, foi realizada por bactérias da espécie *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041. Estas bactérias foram obtidas do banco de cepas americano "American Type Culture Collection – ATCC", e mantidas em freezer de -20ºC em criotubos com meio contendo 10,0g de caseína, 5,0g extrato de levedura e glicerol 20%. As cepas foram ativadas mediante a suspensão de células em um meio líquido MRS (Manga-Rogosa-Sharpe, Tabela 4.4), para obtenção das células microbianas.

Tabela 4.4 Componentes meio líquido MRS

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO PARA 1 L DE MEIO DE CULTIVO MRS
Peptona	10,0 g
Extrato de carne	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Glicose	20,0 g
Tween 80	1,0 mL
Citrato de amônio	2,0 g
Acetato de sódio	5,0 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Sulfato de manganês	0,05 g
Fosfato dipotássico	2,0 g
pH: 6,5 ± 0,2	

Inicialmente, o meio MRS foi preparado sem a adição da glicose (risco de caramelização do meio) e esterilizado. Desta forma, foram preparados frascos de penicilina contendo 63,0mL de meio de cultivo autoclavados e posteriormente adicionados a este meio 7,0mL da solução de glicose a 20g/L previamente esterilizada. O criotubos foram então inoculados em frascos de penicilina a temperatura de 37ºC, sob agitação de 120rpm, em condições de anaerobiose, por 24 horas e passaram por uma série de dois repiques sucessivos.

As células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e foram ressuspensas em água destilada para análise de peso seco e realização da curva padrão.

Para avaliar a fermentabilidade do hidrolisado obtido a partir da CAPD, foi realizado um ensaio em biorreator Biostat B (*B. Braun Biotech International – Germany*) com capacidade de 1,5L e volume reacional de 0,3L, operando em modo batelada simples (Figura 4.4). O hidrolisado foi esterilizado a 0,5atm por 20min e diluído 1,3 vezes, na intenção de se obter no meio uma concentração de glicose de em média 40g/L. Tal diluição resultou também na suplementação do meio de fermentação, uma vez que foi realizada com o meio MRS sem açúcar, nas mesmas concentrações em que foram empregados nos meios de ativação e propagação da levedura, conforme descrito anteriormente na Tabela 4.4. A temperatura do meio foi mantida em 37ºC, pH 6,5±0,2, controlado por meio da adição de NaOH 2M e foi velocidade de agitação 150rpm. Foram inoculados aproximadamente 0,25g/L de células (massa seca).

O perfil cinético do consumo dos substratos e da produção de ácido lático foi construído com base em amostragens realizadas até a fase de declínio de concentração celular e estagnação do consumo de substrato. As amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 15min a 10ºC. O sobrenadante foi separado e devidamente diluído para determinação da quantidade de açúcares totais e ácido lático por HPLC.

Figura 4.5 Biorreator para a fermentação lática a partir da CAPD hidrolisada, inoculado com *L. pentosus* em operação por batelada simples

Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS

Um dos objetivos principais do presente estudo foi observar a interação e o sinergismo entre as enzimas: celulases e hemicelulases. Desta forma, foi escolhido o pré-tratamento alcalino visto que é caracterizado basicamente como um processo de deslignificação, e que tem por consequência o aumento a acessibilidade às frações C5 (hemicelulose e xilanas repreciptadas) e C6 (celulose) do material lignocelulósico.

A Tabela 5.1 apresenta a composição das biomassas lignocelulósicas utilizadas na primeira etapa do estudo. O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado *in natura* e após o pré-tratamento alcalino proposto (Passos, 2018); e a polpa celulósica caracterizada após moagem, como explicitado no tópico 4.1.2 desta dissertação.

Tabela 5.1 Composição bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento alcalino e polpa celulósica

BIOMASSA	%GLUCANAS	%XILANAS	%LIGNINA	%CINZAS
Bagaço *in natura*	34,8±1,5	18,5±1,1	25,9±2,1	1,5±0,4
CAPD	48,6±2,0	19,1±0,9	7,0±0,7	1,8±0,9
Polpa celulósica	71,4±1,1	12,5±0,6	0,2±0,1	0,8±0,2

CAPD: celulignina alcalina parcialmente deslignificada.

Dependendo das condições do pré-tratamento, pode haver solubilização da fração hemicelulósica. Entretanto, no processo aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar, otimizado por Vásquez *et al.* (2007), utiliza-se de condições brandas, e como é possível observar na Tabela

5.1, não implicou na redução percentual de xilanas, que se manteve aproximadamente constante, do ponto de vista estatístico. Todavia, foi atingida, por meio do processo de pré-tratamento, a redução considerável em aproximadamente 73% no teor de lignina, o que consequentemente resultou no aumento do teor de glucanas que passou de 34,8% a 48,6%. Ressalta-se que são objetivos do pré-tratamento: a desorganização do complexo lignocelulósico, redução da cristalinidade, aumento da acessibilidade das enzimas à celulose, que têm como resultado a melhoria nos rendimentos de hidrólise.

A polpa celulósica apresentou um alto potencial para produção de hidrolisado concentrado de glicose, uma vez que contém elevado teor de glucanas, de mais de 70%, e praticamente um percentual nulo de lignina, indicando que ambas as frações, celulósica e hemicelulósica, estão prontamente disponíveis para hidrólise. No entanto, é possível observar que para as análises propostas nesse trabalho a CAPD mostra-se mais interessante, uma vez que apresenta a proporção de xilanas:glucanas mais aproximado e facilita a observação dos efeitos sinérgicos entre as enzimas empregadas.

5.2 ATIVIDADES DAS ENZIMAS ESTUDADAS

As enzimas utilizadas para análises de sinergismo e produção do hidrolisado concentrado tiveram suas atividades quantificadas, bem como sua concentração de proteínas. A Tabela 5.2, explicita a compilação dos dados obtidos.

Tabela 5.2 Quantificação das principais atividades enzimáticas e concentração de proteínas referente a todas quatro enzimas utilizadas no âmbito desta dissertação

ATIVIDADE (U/L)	CELULASE SIGMA®	XILANASE SIGMA®	EXTRATO LADEBIO	CELIC® C-TEC2
Avicelases	101,4	0,08	64,3	185,1
CMCases	200,3	7,4	331,4	7759,5
FPase	27,9	0,04	30,1	345,5
β-glucosidases	820,5	0,01	54,9	9502,8
Xilanases	338,8	3959,2	557,9	9072,3
CONCENTRAÇÃO (g/L)				
Proteínas	0,66	0,68	5,45	84,72

Com relação às atividades enzimáticas da Celulase da Sigma® observam-se atividades relativamente baixas quanto comparadas as do *pool* enzimático da Celic C-Tec2. Isso se explica pelo fato da Celulase da Sigma® ser uma enzima purificada, e nesse processo perde-se produtividade, uma vez que se faz necessária diversas etapas de microfiltração e

ultrafiltração para se obter um preparado que contenha, em sua composição principal, enzimas responsáveis pela ruptura de ligações β-1,4 glicosídicas de moléculas de celulose. Da mesma forma, é constatado na Tabela 5.2 que a Xilanase da Sigma® apresenta alto grau de pureza, em razão da obtenção das baixas atividades celulásicas quantificadas e elevada atividade xilanásica.

Já o extrato enzimático LADEBIO mostra-se eficiente, na medida em que apesar de seu rendimento quantitativo ser similar ao da Celulase da Sigma®, sua concentração de proteínas é aproximadamente nove vezes maior que a da celulase purificada. Isso indica a necessidade do uso de uma proporção menor do preparado obtido em laboratório quando comparado à enzima comercial. Tal particularidade evidência a utilização do preparado LADEBIO para continuidade do presente trabalho, bem como de futuras pesquisas, posto que a produção de forma dedicada (*in plant production*) é uma opção interessante em razão da eficiência de hidrólise da biomassa lignocelulósica ser fortemente associada à composição dos preparados enzimáticos. Além disso, a produção dedicada dos coquetéis enzimáticos está incorporada ao conceito de Biorrefinaria, que envolve a diversificação do uso da biomassa para a obtenção de biocombustíveis, produtos químicos, energia e também de outros insumos necessários aos processos produtivos, como as enzimas.

5.3 Escolha da biomassa e Estudo de sinérgico entre celulases e xilanases

A tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos a partir de experimentos de hidrólise enzimática a fim de comprovar a teoria descrita no tópico 2.6 e seus subtópicos, o que proporcionou a escolha da biomassa para seguimento da pesquisa.

Tabela 5.3 Hidrólise enzimática para escolha da biomassa e estudo de sinergismo. Ensaio realizado utilizando teor de sólidos de 1,0% e cargas enzimáticas de $10mg_{proteína}/g_{celulose}$, por 24h, a 50ºC em 200rpm

Ensaio	Eficiência Hidrolítica (%)		Grau de Sinergismo	
	Polpa	CAPD	Polpa	CAPD
Celulase Sigma®$_{(24h)}$	30,53 ± 0,62	31,16 ± 3,80		
Xilanases Sigma®$_{(24h)}$	4,71 ± 0,22	3,37 ± 0,13	**1,13**	**1,25**
PT Xilanase$_{(24h)}$ + Celulase$_{(24h)}$	39,80 ± 0,38	43,05 ± 1,70		

Dos resultados mostrados na tabela 5.3 é possível observar que há relação sinérgica positiva entre ambas às enzimas, uma vez que o grau de sinergismo apresenta valor

>1.0 nas duas situações. Isso é o mesmo que dizer que elas cooperam entre si, e adicionando uma no meio reacional de outra, obtêm-se aumento na eficiência hidrolítica.

Outro cenário que deve ser salientado é o fato da polpa celulósica apresentar o percentual sinérgico inferior ao da celulignina, apesar de apresentar maior disponibilidade de seus açúcares, por ter menor teor de lignina na sua composição e uma proporção maior de celulose quando comparada a outra biomassa. Desta forma, a biomassa CAPD destaca-se, pois apresenta uma estrutura que permite 25% de sinergia entre as enzimas estudadas. Tal resposta pode ser explicada reiterando o que foi abordado no tópico 5.1 desta discussão: o fato da CAPD apresentar maior proporção de xilanas em sua composição e possibilitar melhor observação do efeito sinérgico entre ambas às enzimas.

Após o ensaio de escolha de biomassa foi realizado um ensaio similar, com objetivo de confirmar os dados obtidos no experimento anterior, bem como avaliar o potencial de sinergismo entre alguns *pools* enzimáticos. Os resultados obtidos estão descritos a tabela 5.4 e mostram que mesmo com coquetéis mistos é possível observar a ação sinérgica das xilanases atuando sobre o substrato e, consequentemente facilitando o acesso à celulose.

Tabela 5.4 Experimentos de hidrólise realizados para estudo sinérgico entre *polls* enzimáticos. Os ensaios realizados com Celulase da Sigma® e o extrato LADEBIO foram realizados com teor de sólidos de 2,5% e carga de proteínas de $10mg_{proteína}$ /$g_{celulose}$ enquanto os ensaios envolvendo o *pool* enzimático da Celic C-Tec2 foi realizado com teor de sólido de 20% e carga de proteínas de $20mg_{proteína}$ /$g_{celulose}$, todos os ensaios foram realizados a 50ºC, por 24h em 200rpm

ENSAIO	EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA (%)		
	SIGMA®	EXTRATO LADEBIO	CELIC® C-TEC2
$Celulase_{(24h)}$	40,2 ± 1,8	86,9 ± 1,3	62,4 ± 2,7
Xilanase $Sigma^{®}_{(24h)}$	4,64 ± 0,2	-*	-**
$Xilanase_{(24h)}$ + $Celulase_{(24h)}$	49,7 ± 0,6	94,6 ± 0,8	66,5 ± 1,0
PT $Xilanase_{(24h)}$ + $(Celulase + Xilanase)_{(24h)}$	54,9 ± 0,8	100 ± 0,6	73,5 ± 1,2
GRAU DE SINERGISMO (s/ PT)	**1,11**	**1,03**	**1,06**
GRAU DE SINERGISMO (PT)	**1,23**	**1,09**	**1,17**

PT: pré-tratamento; s/PT: sem pré-tratamento
* Foi utilizado o mesmo percentual de hidrólise usado para quantificar o grau de sinergismo do experimento com as celulases da Sigma®.
** Quando utilizada as xilanases Sigma® em teor de sólidos elevado, as enzimas apresentaram eficiência hidrolítica praticamente nula (0,2 ± 0,0).

Nota-se que adicionando xilanases em um coquetel enzimático completo e eficiente como a Celic C-Tec2 é possível a observação de sinergia entre ambos, o que mostra a eficiência destas enzimas como proteínas auxiliares. Entretanto, este ensaio foi realizado

com 20% de teor de sólidos, e o dobro de carga de proteínas que nos outros dois, e desta forma não há possibilidade de serem feitas análises entre os três ensaios, uma vez que a diferença entre as condições experimentais não permitem fazer incursões comparativas sobre o grau de sinergismo.

O ensaio realizado com as celulases da Sigma® validou o experimento proposto anteriormente uma vez que alcançou um percentual sinérgico de 23%, valor próximo ao obtido no ensaio preliminar (25%). O coquetel formado pelo extrato enzimático produzido no LADEBIO e a xilanase purificada também apresentou grau de sinergismo. Apesar de este extrato apresentar grau de sinergismo de aproximadamente 60% inferior ao obtido com a enzima comercial purificada, utilizou-se o preparado LADEBIO para dar continuidade ao trabalho visando explorar o potencial de hidrólise deste preparado por meio do sinergismo dessas duas importantes entidades enzimáticas responsáveis pela monomerização dos polissacarídeos das biomassas lignocelulósicas.

Ainda que todos os percentuais obtidos para eficiência hidrolítica tenham sido superiores com prévio tratamento enzimático da biomassa com xilanase, optou-se por dar continuidade às pesquisas sem o mesmo, posto que a diferença entre as eficiências com e sem o pré-tratamento não foram estatisticamente significativas a ponto de se considerar a possibilidade de incluir mais esta etapa ao processo. Ou seja, a existência de xilanase no preparado LADEBIO já seria suficiente para dar o sinergismo necessário para a eficiente hidrólise da celulose.

5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA REACIONAL

Na intenção de se obter um sistema otimizado de produção de hidrolisado concentrado, deve-se buscar a proporção ideal entre as enzimas utilizadas, empregando o menor volume possível de ambas, associada a uma condição de alto teor de sólidos. Para tal, foi realizado um planejamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR). As variáveis independentes adotadas foram o teor de sólidos e as cargas de celulases e xilanases, e como variáveis dependentes a eficiência hidrolítica e quantidade de glicose liberada após 24 horas de experimento.

A Tabela 5.5 apresenta a matriz do planejamento e os valores das variáveis de resposta obtidos em cada condição experimental. A priori, observa-se que foram obtidas altas

taxas de eficiência. Entretanto, nota-se que dentro destes parâmetros a produção de glicose encontra-se extremamente reduzida, o que é justificável pelo baixo teor de sólidos disponível no meio, que consequentemente disponibiliza menos celulose para conversão. Isso indica que a eficiência hidrolítica e o teor de sólidos são parâmetros de valores inversamente proporcionais. Quanto à produção de glicose é possível observar que o maior valor obtido, de 53,9g/L, ocorreu no experimento 10, quando o teor de sólidos disponível era maior, de 18,4%, o que indica uma relação direta entre as duas grandezas (teor de sólidos e produção de glicose).

Tabela 5.5 Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis de resposta. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®, com triplicata do ponto central (C) para a otimização de sistema de produção de hidrolisado fermentável altamente concentrado

EXPERIMENTO	TEOR DE SÓLIDOS (%)	CARGA DE CELULASE (mg/g)	CARGA DE XILANASE (mg/g)	EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA (%)	PRODUÇÃO DE GLICOSE (g/L)
01	5,0	10,0	10,0	79,8	21,5
02	5,0	10,0	20,0	100,1	27,0
03	5,0	20,0	10,0	92,7	25,0
04	5,0	20,0	20,0	102,0	27,5
05	15,0	10,0	10,0	57,5	46,5
06	15,0	10,0	20,0	55,3	44,7
07	15,0	20,0	10,0	65,0	52,6
08	15,0	20,0	20,0	57,9	46,8
09	1,59	15,0	15,0	109,5	9,4
10	18,4	15,0	15,0	54,3	53,9
11	10,0	6,59	15,0	63,5	34,3
12	10,0	23,4	15,0	77,4	41,7
13	10,0	15,0	6,59	73,0	39,4
14	10,0	15,0	23,4	84,5	45,6
15 (C)	10,0	15,0	15,0	71,1	38,4
16 (C)	10,0	15,0	15,0	72,4	39,1
17 (C)	10,0	15,0	15,0	70,1	37,8

Os valores obtidos nos experimentos propostos foram transcritos para o *software STATISTICA*, versão 8.0 (STATSOFT, Inc.). A significância estatística foi estabelecida pelo valor de p menor que 0,05, considerando intervalo de confiança de ±95%. A interação entre as três variáveis foi inclusa no modelo a fim de alcançar melhores resultados. Para análise do erro experimental optou-se pelo *Puro Erro* na tabela ANOVA.

As Análises de Variância (ANOVA) para ambas as respostas são expostas na Tabela 5.6 e 5.7. Para a resposta eficiência de hidrólise, os fatores (1) teor de sólidos linear e

quadrático, (2) carga celulases linear, (3) carga xilanases linear e a interação entre teor de sólidos e carga de xilanases (1 *by* 3) são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Ademais, o modelo obtido é viável, uma vez que o coeficiente de determinação do ajuste apresenta valor muito próximo a 1.0 ($R^2 = 0,99427$), bem como a falta de ajuste (*Lack of Fit*) não apresenta relevância estatística ($p = 0,652336$).

Tabela 5.6 Tabela ANOVA do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta **Eficiência Hidrolítica.** Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®

FATOR	Var.:Eficiência Hidrólise (%); R-sqr=,99427; Adj:,9869 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=4,643029				
	SS	**df**	**MS**	**F**	***p***
(1) Teor de Sólidos (%)(L)	3934,059	1	3934,059	847,3045	0,001178
Teor de Sólidos (%)(Q)	157,727	1	157,727	33,9708	0,028198
(2) Carga Celulases (mg/g)(L)	170,657	1	170,657	36,7556	0,026144
Carga Celulases (mg/g)(Q)	1,047	1	1,047	0,2255	0,681679
(3) Carga Xilanases (mg/g)(L)	115,709	1	115,709	24,9209	0,037863
Carga Xilanases (mg/g)(Q)	78,700	1	78,700	16,9502	0,054241
1L by 2L	2,701	1	2,701	0,5818	0,525283
1L by 3L	191,605	1	191,605	41,2672	0,023386
2L by 3L	31,975	1	31,975	6,8867	0,119690
Lack of Fit	17,656	5	3,531	0,7606	0,652336
Pure Error	9,286	2	4,643		
Total SS	4700,933	16			

Tabela 5.7 Tabela ANOVA do DCC realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta **Produção de Glicose**. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®

FATOR	Var.:Produção Glicose (g/L); R-sqr=0,98612; Adj:0,96828 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=1,351201				
	SS	**df**	**MS**	**F**	***p***
(1) Teor de Sólidos (%)(L)	1978,396	1	1978,396	1464,176	0,000682
Teor de Sólidos (%)(Q)	68,325	1	68,325	50,566	0,019208
(2) Carga Celulases (mg/g)(L)	44,997	1	44,997	33,301	0,028740
Carga Celulases (mg/g)(Q)	0,562	1	0,562	0,416	0,585191
(3) Carga Xilanases (mg/g)(L)	8,675	1	8,675	6,420	0,126807
Carga Xilanases (mg/g)(Q)	21,053	1	21,053	15,581	0,058598
1L by 2L	2,222	1	2,222	1,644	0,328276
1L by 3L	30,519	1	30,519	22,587	0,041535
2L by 3L	6,116	1	6,116	4,527	0,167195
Lack of Fit	28,163	5	5,633	4,169	0,204726
Pure Error	2,702	2	1,351		
Total SS	2224,273	16			

Com relação à produção de glicose, observa-se que os fatores (1) teor de sólidos linear e quadrático, (2) a carga de celulases linear e a interação entre teor de sólidos e carga de

xilanases (1 *by* 3) são estatisticamente significativos, dado os valores de *p*. Através do coeficiente de determinação do ajuste (R^2 = 0,98612) e da irrelevância estatística do *Lack of Fit* (*p* = 0,204726) é possível afirmar que o modelo gerado também encontra-se adequado.

A Tabela 5.8 e 5.9 apresenta os efeitos estimados dos fatores para as variáveis de resposta de eficiência hidrolítica e produção de glicose, respectivamente. Na Tabela 5.8, observa-se que entre as variáveis significativas ($p < 0,05$) o teor de sólidos (efeito linear) exerce efeito negativo, o que mostra que o acréscimo na proporção desta variável estará diretamente relacionado à redução na eficiência de hidrólise. Ao ponto que é notado efeito positivo em ambas variáveis significativas relacionadas às cargas de proteínas, revelando que o aumento ou redução entre os fatores e a variável de resposta são diretamente proporcionais.

A interação entre teor de sólidos e a carga de xilanase (1 *by* 3) também apresentou significância estatística, mostrando efeito negativo, o que corrobora como o ensaio realizado com diferentes cargas de sólido discutidos na Seção 5.3, Tabela 5.4, deste trabalho. Neste ensaio, foram realizadas hidrólises de 24h com teor de sólidos de 2,5% e 20% e a interferência do aumento do teor de sólidos claramente observada, uma vez que as eficiências hidrolíticas obtidas foram de 4,6% e 0,2%, respetivamente, uma queda de 95,7% na variável de resposta.

No que diz respeito à produção de glicose, o teor de sólidos mostra um efeito positivo, uma vez que quanto maior a oferta de substrato, maior será a geração deste glicídio. Com relação às cargas proteicas, apenas as celulases mostraram-se relevantes na produção de glicose, o que pode ser explicado pelo fato destas enzimas serem específicas para a produção deste bloco de construção para processos fermentativos.

Tabela 5.8 Tabela de efeitos estimados do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta **Eficiência de Hidrólise**. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®

FATOR	Effect Estimates; Var.:Eficiência Hidrólise (%); R-sqr=,99427; Adj:,9869 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=4,643029					
	Efeito	Std.Err.	t(2)	*p*	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	70,6608	1,241622	56,9101	0,000309	65,3186	76,0031
(1)Teor de Sólidos (%)(L)	-33,9449	1,166152	-29,1085	0,001178	-38,9625	-28,9274
Teor de Sólidos (%)(Q)	7,4809	1,283521	5,8284	0,028198	1,9584	13,0035
(2)Carga Celulases (mg/g)(L)	7,0700	1,166152	6,0626	0,026144	2,0524	12,0875
Carga Celulases (mg/g)(Q)	-0,6095	1,283521	-0,4749	0,681679	-6,1321	4,9130
(3)Carga Xilanases (mg/g)(L)	5,8215	1,166152	4,9921	0,037863	0,8040	10,8391
Carga Xilanases (mg/g)(Q)	5,2843	1,283521	4,1171	0,054241	-0,2382	10,8069
1L by 2L	-1,1622	1,523652	-0,7628	0,525283	-7,7180	5,3935

FATOR	Effect Estimates; Var.:Eficiência Hidrólise (%); R-sqr=,99427; Adj:,9869 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=4,643029					
	Efeito	Std.Err.	t(2)	*p*	-95,%	+95,%
1L by 3L	-9,7879	1,523652	-6,4240	0,023386	-16,3436	-3,2321
2L by 3L	-3,9985	1,523652	-2,6243	0,119690	-10,5542	2,5573

Tabela 5.9 Tabela de efeitos estimados do DCCR realizado com três repetições do ponto central para a variável de resposta **Produção de Glicose**. Planejamento experimental do tipo composto central rotacional realizado com a CAPD, realizado com o preparado enzimático LADEBIO e com a xilanase purificada da Sigma®

FATOR	Effect Estimates; Var.:Produção Glicose (g/L); R-sqr=,98612; Adj:,96828 (Spreadsheet1) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=1,351201					
	Efeito	Std.Err.	t(2)	*p*	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	38,13576	0,669805	56,93558	0,000308	35,25382	41,01771
(1)Teor de Sólidos (%)(L)	24,07195	0,629093	38,26456	0,000682	21,36518	26,77872
Teor de Sólidos (%)(Q)	-4,92370	0,692408	-7,11098	0,019208	-7,90289	-1,94451
(2)Carga Celulases (mg/g)(L)	3,63033	0,629093	5,77074	0,028740	0,92356	6,33710
Carga Celulases (mg/g)(Q)	-0,44640	0,692408	-0,64471	0,585191	-3,42560	2,53279
(3)Carga Xilanases (mg/g)(L)	1,59396	0,629093	2,53375	0,126807	-1,11281	4,30073
Carga Xilanases (mg/g)(Q)	2,73309	0,692408	3,94723	0,058598	-0,24610	5,71228
1L by 2L	1,05402	0,821949	1,28234	0,328276	-2,48254	4,59058
1L by 3L	-3,90636	0,821949	-4,75256	0,041535	-7,44293	-0,36980
2L by 3L	-1,74877	0,821949	-2,12759	0,167195	-5,28533	1,78779

Os diagramas de Pareto gerado para ambas as variáveis de resposta corroboram todos os dados relatados anteriormente nas tabelas e são exibidos na Figura 5.1. Dessa forma, é possível afirmar que o teor de sólidos é o fator mais relevante para determinação das duas variáveis de respostas adotadas para esse planejamento, posto que apesar de apresentar influência negativa na eficiência de hidrolise, ainda assim, é o fator que mais se destaca.

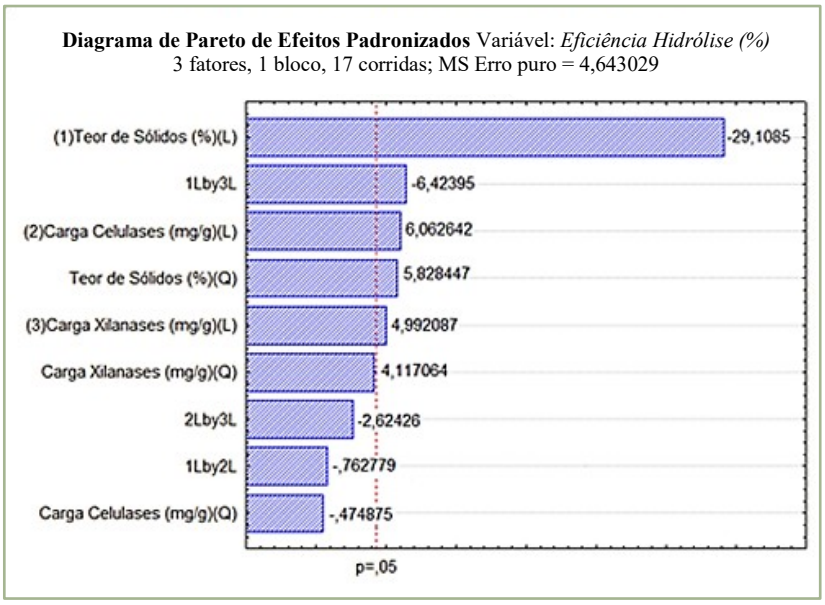


Figura 5.1 Diagrama de Pareto gerado para variável de resposta ***eficiência de hidrólise***

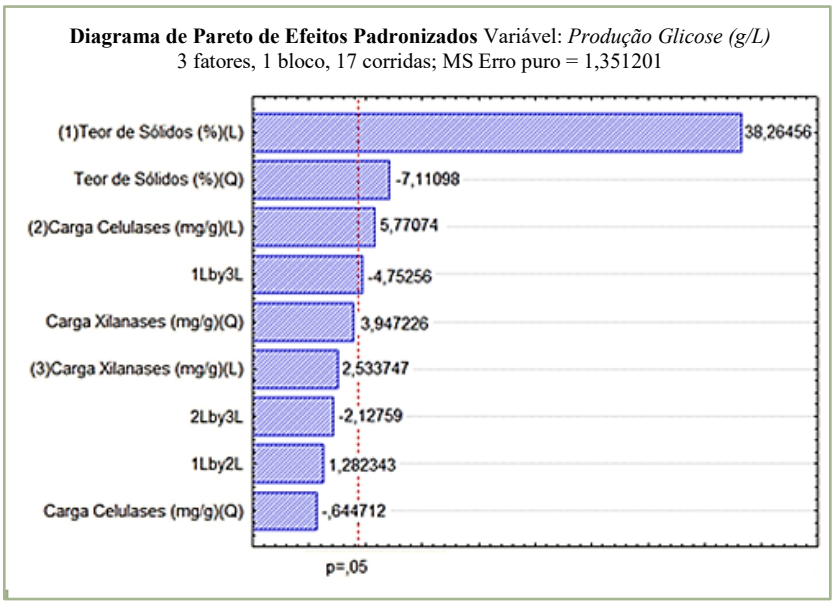


Figura 5.2 Diagrama de Pareto gerado para variável de resposta ***produção de glicose***

Para obtenção dos valores da condição ótima do processo hidrolítico, foram gerados gráficos a partir da função "*Desirability*" do *software*. A função mostrou que o modelo conseguiu otimizar cerca de 80% das variáveis em conjunto. Os valores obtidos foram dispostos na função "values predicted for dependent variables" (valores preditos para variáveis dependentes) que forneceu valores preditos em um intervalo de confiança de -95% e +95%. A Figura 5.2 apresenta o gráfico de otimização que engloba a proporção ideal das três variáveis independentes utilizadas no planejamento.

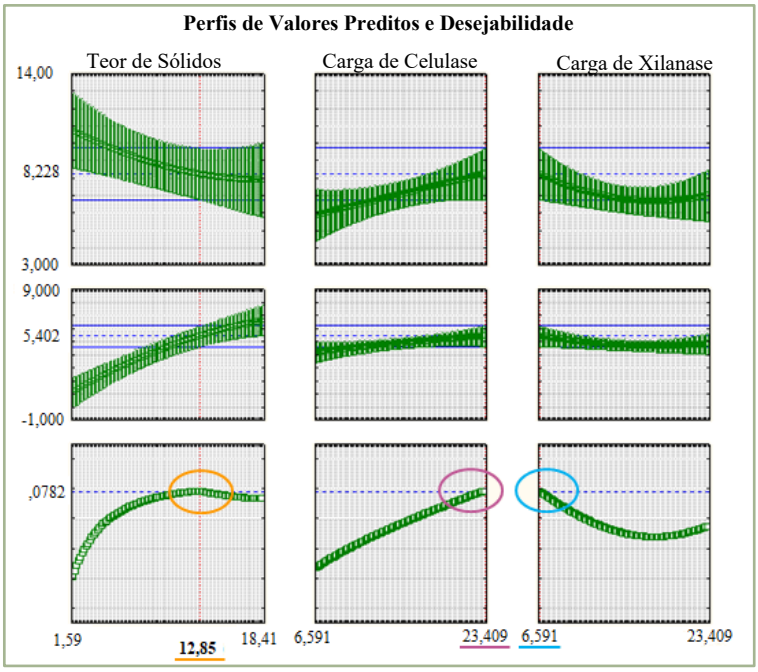


Figura 5.3 Gráficos de otimização de proporções das variáveis independentes estudadas no DCCR

Observa-se através do gráfico que o melhor teor de sólidos para o processo, de acordo com o modelo proposto é de 12,8% (m/v), empregando a carga de celulases em sua maior proporção estudada e carga de xilanases em menor proporção. Dessa forma, a condição otimizada proposta seria de 12,8% (m/v) de teor de sólidos, carga de celulases de $23{,}4mg_{proteína}/g_{celulose}$ e carga de xilanases de $6{,}6mg_{proteína}/g_{celulose}$.

A Tabela 5.10 apresenta os valores preditos e seus intervalos de confiança calculados pelo *software* para ambas as variáveis de resposta, bem como os valores obtidos no ensaio de validação experimental. O ensaio de validação foi realizado com quatro replicatas nas condições das variáveis independentes propostas pelo programa e variáveis constantes (pH, temperatura e agitação) similares as aplicadas nos ensaios anteriores. Nota-se que os valores obtidos tanto para eficiência hidrolítica, quanto para produção de glicose, mantiveram-se dentro do intervalo de confiança previsto, indicando a validação do sistema e otimização das variáveis do processo.

Tabela 5.10 Valores preditos calculados pelo *software* STATISTICA e valores obtidos em experimentos de validação do planejamento

	VARIÁVEIS DE RESPOSTA	
	EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA (%)	PRODUÇÃO GLICOSE (g/L)
Valores Preditos	82,3	54,0
-95% conf.	67,4	45,9
+95% conf.	97,2	62,1
Valores Obtidos	**88,6 ± 2,2**	**61,5 ± 1,5**

5.5 PRODUÇÃO DE HIDROLISADO CONCENTRADO E CURVA CINÉTICA DE EFICIÊNCIA

Uma vez o processo otimizado, foi proposto o aumento do volume reacional para possível fermentação do hidrolisado enzimático gerado. Desta forma, foram produzidos 230mL de hidrolisado a partir de 29,6g da biomassa CAPD, 139,9mL de xilanase da Sigma® e 61,7mL do extrato enzimático produzido *in situ*.

A hidrólise enzimática correu por 32 horas e a concentração máxima de glicose e xilose obtida foi de 69,2g/L e 28,7g/L, respectivamente, totalizando 107,7g/L de açúcares totais, quando considerados também os 1,7g/L de celobiose e 8,1g/L de arabinose liberados no processo. A Figura 5.4 exibe o gráfico gerado a partir dos valores obtidos em HPLC para

açúcares produzidos no processo e o percentual da eficiência hidrolítica alcançada calculada sobre a produção de glicose.

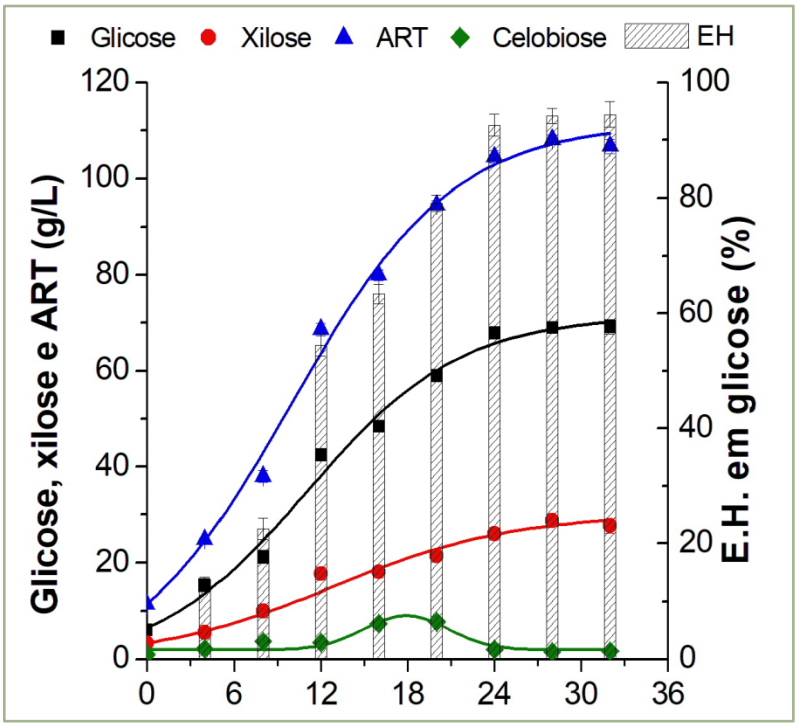


Figura 5.4 Produção de açúcares no processo de hidrólise enzimática e percentual da eficiência hidrolítica em produção de glicose. O sistema ótimo obtido no planejamento foi aplicado, desta forma o teor de sólidos foi de 12,8% (m/v), carga de celulases de 23,4 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ e carga de xilanases de 6,6 $mg_{proteína}/g_{celulose}$

A partir do gráfico é possível observar a crescente liberação de glicose e xilose e consequente aumento dos açúcares redutores totais, que equivale à soma total dos açúcares liberados no processo. Com relação ao perfil da celobiose, nota-se que ao passo que sua liberação se inicia, por efeito sinérgico das endoglucanases e, posteriormente, das exoglucanases, observa-se a presença e ação das β-glucosidades presentes no extrato enzimático, responsáveis por clivar suas ligações, liberando glicose e, mantendo assim sua concentração em um intervalo constante.

A eficiência de hidrólise calculada a partir da glicose produzida atingiu o percentual máximo de 94% ao final do ensaio, valor este que se encontra dentro do intervalo de confiança proposto pelo *software* STATISTICA nos ensaios de otimização das variáveis independentes propostas para o processo estudado. Dessa forma, é possível afirmar que a fração líquida obtida através da hidrólise enzimática da CAPD com o coquetel misto contendo, aproximadamente 78% de extrato enzimático elaborado no LADEBIO e 22% de xilanase purificada da Sigma®, foi altamente produtivo e rico em açúcares fermentáveis.

A adição de xilanases a um coquetel enzimático para a degradação de celulignina parcialmente deslignificada aumenta a eficiência de hidrólise, uma vez que a liberação de glicose aumenta com a liberação de xilose (Kumar e Wyman, 2009). Pode-se observar que a proporção de glicose presente nos açúcares totais produzidos no início da hidrólise não coincide com o percentual encontrado ao término do processo. Isso pode ser explicado pelo efeito sinérgico presente entre as enzimas atuantes.

A xilanase da Sigma® foi adicionada ao coquetel com o propósito de facilitar o acesso a celulose e agir não apenas nas xilanas presentes na matriz lignocelulósica, como também nas xilanas reprecipitadas por conta do processo de pré-tratamento aplicado a biomassa. Uma vez observado esta divergência no percentual de glicose inicial/final, que era de 61,7% e passou a 64,3%, é possível afirmar que houve ação sinérgica entre celulases e xilanases, onde a xilose foi liberada aumentando a permeabilidade e acessibilidade de outros biocatalisadores à celulose.

O processo de hidrólise enzimática pode ser separado em três etapas distintas, sendo a primeira uma fase de liquefação, que se caracteriza pela rápida liberação de produtos, uma vez que as enzimas são imediatamente adsorvidas e atuam no substrato prontamente disponível. Logo após, segue uma fase intermediária, onde a taxa hidrolítica é considerada moderada e cerca de 50-70% da biomassa já se encontra hidrolisada; uma última fase, descrita como a mais lenta, em que acontece a diminuição inevitável da taxa de hidrólise, posto que a região amorfa do substrato deva ter sido assimilada e o mesmo passa a sua forma mais recalcitrante (Arantes *et al.*, 2011). Esta última fase descrita pelos autores pode ser claramente observada a partir de 24h de hidrólise onde na produção de glicose, por exemplo, não houve diferença estatística significativa nos valores de concentração (67,9g/L, 68,9g/L e 69,1g/L).

5.6 Produção de Ácido Lático a partir do Hidrolisado Enzimático Obtido

Com a intenção de avaliar a fermentabilidade do xarope rico em açúcares obtido no processo de hidrólise enzimática da CAPD, nas condições ótimas referidas anteriormente, foi realizada uma fermentação láctica utilizando a bactéria *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041. O meio reacional foi suplementado com meio MRS sem açúcar, conforme descrito anteriormente na seção 4.9 do presente trabalho. Foram inoculados aproximadamente 0,25g/L de células (massa seca), de forma a permitir altas taxas de formação de produto de interesse, como pode ser observado na Figura 5.5.

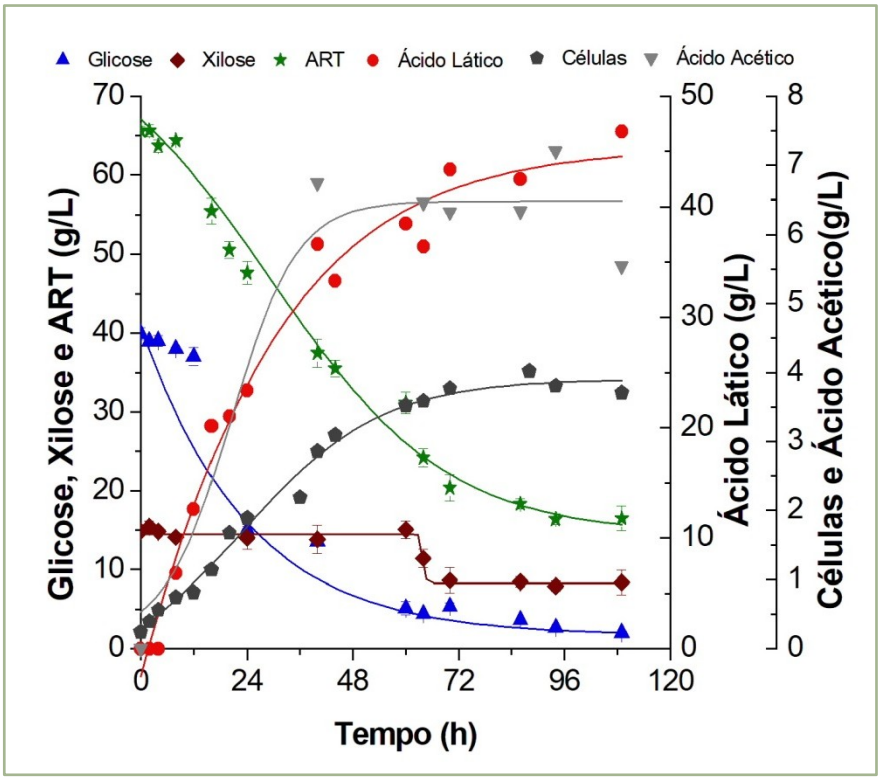


Figura 5.5 Cinética de fermentação de ácido lático produzido a partir do hidrolisado de CAPD por *L. pentosus* ATCC 8041 em biorreator de batelada simples, com pH 6,5 em anaerobiose a 37ºC e 150rpm

Pela Figura 5.5 é possível afirmar que o processo fermentativo estudado apresenta a cinética de formação do produto associada ao crescimento celular, uma vez que ambos os perfis seguem correlacionados do início ao fim do experimento. A taxa específica de crescimento celular (μ) foi calculada baseando-se nas primeiras 24 horas de amostragem, e alcançou o valor de $0{,}07h^{-1}$, o que corresponde a um tempo de duplicação da massa celular de 9,9 horas.

Pelo perfil cinético do consumo de glicose e xilose constatado na Figura 5.5 verifica-se inibição do consumo de xilose em concentrações superiores a 15g/L de glicose, abaixo da qual a xilose passa ser consumida. Isto pode decorrer graças a possível preferência da bactéria a metabolização primária da glicose, para iniciar o consumo de um novo substrato disponível no meio, apenas após o consumo quase que total das moléculas de glicose disponíveis. Apesar da concentração de ácido lático ter se apresentado elevada (46,8g/L), nenhum dos açúcares foram completamente consumidos, que é justificado pela provável intolerância da bactéria pelo seu produto principal, bem como de subprodutos gerados, como a obtenção de 7,2g/L de ácido acético, em se tratando de uma heterofermentação.

A produtividade volumétrica máxima, $Q_{Pmáx}$, alcançou o valor de $1{,}26g/L.h^{-1}$ às 16 horas de processo. Na Figura 5.5, observa-se que o consumo de glicose passa a ser

moderado a partir das 70 horas de curso experimental, enquanto a xilose apresenta um rápido consumo, mesmo que baixo, estabilizando logo em seguida. A produtividade volumétrica neste ponto foi de 0,62 g/L.h^{-1} e a redução percentual de substrato de 65,8%, em relação aos açúcares redutores totais (ART), e 87,5% em relação à glicose, valores considerados eficientes para o processo apresentado.

Para quantificação dos coeficientes de rendimento os valores foram calculados em relação aos açúcares redutores totais do meio. Avaliou-se quanto de ácido lático foi formado por unidade de substrato consumido ($Y_{P/S}$), obtendo-se um valor de 0,95g/g; alcançando 11,7g de produto formado/g de célula produzida; e um total de 0,08g de células produzidas/g substrato consumido. A eficiência de fermentação foi de 85,1%, similar às eficiências encontradas na literatura. Isso pode ser explicado pela presença de pequenos oligossacarídeos no hidrolisado que a bactéria tenha sido capaz de metabolizar, assim como a existência de outros açúcares fermentáveis, como a celobiose e a arabinose detectados.

Embora não tenha sido realizado estudos de otimização, os resultados obtidos nesta dissertação são positivos quando comparados a alguns estudos recentes reportados na literatura, como pode ser observado na Tabela 5.11. Jaramillo (2014) avaliou o processo SSF com a cepa *L. coryniformis* subsp. *torquens* ATCC® 25600, a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. O processo foi conduzido em batelada simples, e alcançou a produção máxima de ácido lático de 29,0g/L, resultando em um valor de rendimento de 0,95 g/g e produtividade volumétrica de 2,4g/L.h. Moraes *et al.* (2016) utilizando a mesma cepa em processo de SHF conseguiram a produção de 57g/L de ácido lático com valores de rendimento e produtividade similares aos obtidos por Jaramillo (2014), de 0,97g/g e 2,8g/L.h respectivamente.

Tabela 5.11 Variáveis de resposta obtidas na produção de ácido lático de segunda geração publicados recententemente na literatura

CEPA	FONTE DE CARBONO / SISTEMA	PRODUÇÃO (g/L)	RENDIMENTO (g/g)	PRODUTIVIDADE (g/L h)	REFERÊNCIAS
Lactobacillus coryniformis subsp. *torquens*	Bagaço de cana de açúcar / SSF	29,0	0,95	2,4	Jaramillo (2014)
Lactobacillus coryniformis subsp. *torquens*	Polpa celulósica / SHF batelada	57,0	0,97	2,8	Moraes *et al.* (2016)

CEPA	FONTE DE CARBONO / SISTEMA	PRODUÇÃO (g/L)	RENDIMENTO (g/g)	PRODUTIVIDADE (g/L h)	REFERÊNCIAS
Bacillus coagulans DSM2314	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratamento ácido / SSF batelada	74,6	0,94	0,92	Pol *et al.* (2016)
L. pentosus ATCC 8041	HH de bagaço de cana-de-açúcar / SSF	42,4	0,71	1,02	Wischral *et al.* (2019)
L. pentosus ATCC 8041	HH e CLPD de bagaço de cana-de-açúcar / SSCF	64,8	0,93	1,01	
***L. pentosus* ATCC 8041**	**CAPD de bagaço de cana-de-açúcar / SHF**	**46,8**	**0,95**	**1,26**	**Esta pesquisa**

HH: Hidrolisado hemicelulósico; CLPD: Celulignina parcialmente deslignificada (pré-tratamento ácido e alcalino); CAPD: Celulignina alcalina parcialmente deslignificada (pré-tratamento alcalino); SSF: fermentação e sacarificação simultâneas

Pol *et al.* (2016), utilizando bagaço de cana-de-açúcar que passou por pré-tratamento ácido, em sistema de SSF inoculando a cepa *Bacillus coagulans* DSM2314 alcançaram uma concentração de 64,1g/L de ácido lático, resultando em 80% de rendimento e 0,78 g/L.h de produtividade, valores semelhantes aos reportados por Wischral *et al.* (2019) quando fazendo uso de ambas frações hidrolisadas disponíveis (C5 e C6), que foram co-fermentadas simultaneamente para a obtenção de ácido lático. Estes autores, aplicando diferentes tipos de pré-tratamentos, conseguiram consumo total de xilose e glicose, o que pode ser decorrência da boa realização dos procedimentos de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática que geraram açúcares prontamente fermentáveis.

A presente dissertação possibilitou estudos de sinergismo, não apenas como prova de conceito, mas também abriu portas para futuros estudos. O hidrolisado enzimático produzido a partir de celulignina alcalina parcialmente deslignificada de bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para geração de ácido lático mostrou eficiente. Isto porque o processo de formação de aproximadamente 47g/L de ácido lático foi realizado a partir de um hidrolisado bruto, ou seja, que não passou por nenhum tipo de destoxificação para remoção de possíveis agentes inibidores, como o furfural e o hidroxi-metil furfural, resultantes dos processos de pré-tratamento que a biomassa foi submetida.

Capítulo 6 – CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou algumas conclusões relevantes no que diz respeito ao estudo sinérgico entre hidrolases e sua inserção dentro de uma importante linha de pesquisa do LADEBIO, que se refere à Engenharia de Produto. Permitiu ainda avaliar processo de pré-tratamento, hidrólise e fermentação do meio hidrolisado gerado. As principais conclusões obtidas são listadas na sequência de realização experimental.

1. Por meio do processo de pré-tratamento alcalino aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar, foi possível atingir redução de 73% no teor de lignina, o que resultou no aumento de 40% no teor das glucanas, enquanto o percentual de xilanas permaneceu constante, demonstrando que as condições para o processo são adequadas para a proposta desta pesquisa;

2. O bagaço de cana-de-açúcar foi escolhido por apresentar maior grau de sinergismo (25%) quando comparado com a polpa celulósica (13%). Apesar de a polpa celulósica apresentar valores de hidrólise semelhantes ao do bagaço de cana pré-tratado com álcalis, que gerou um material sólido denominado celulignina alcalina parcialmente deslignificada (CAPD), optou-se por avaliar o sinergismo com este último material, tendo em vista sua menor proporção de glucanas:xilanas (2,5:1), quando comparada com a proporção da polpa celulósica (6:1), o que levou a um maior impacto no estudo do efeito cooperativo entre celulases e xilanases;

3. O extrato enzimático LADEBIO mostrou-se a melhor opção para continuação dos estudos. Quando em comparação com os demais coquetéis (celulases da Sigma® e Celic® C-Tec2) destaca-se o ponto de ser um coquetel bem balanceado, com todas as enzimas de interesse disponíveis e concentração de proteínas aproximadamente nove vezes maior que a da celulase purificada utilizada. Esse conjunto de fatores permite concluir que a produção *in situ* de hidrolases é mais atraente, podendo ser vantajosa caso seu custo de produção seja inferior ao de aquisição de enzimas comerciais;

4. A adição de xilanase aos preparados enzimáticos Sigma® (comercial) e LADEBIO (laboratorial), resultou em graus de sinergismo de 11% e 3%, respectivamente. Por outro lado, quando realizado um pré-tratamento da biomassa com xilanase por 24 horas, seguido da hidrólise do material pré-tratado com as celulases (SIGMA e LADEBIO) e xilanase adicional, o grau de sinergismo foi aumentado para 23% e 9%, respectivamente. O menor grau de sinergismo observado com o preparado laboratorial deve-se à existência de atividade xilanásica, inexpressiva no preparado comercial;

5. Ainda que todos os percentuais obtidos para eficiência hidrolítica tenham sido superiores com prévio tratamento enzimático da biomassa com xilanase, optou-se por dar continuidade ao trabalho sem o mesmo, isso porque o ganho gerado com o pré-tratamento da biomassa com a xilanase, oneraria o processo hidrólitico na medida em que o dobro da carga xilanásica seria empregado;

6. A realização da técnica de planejamento experimental de *delineamento composto central rotacional*, utilizando como variáveis independentes o teor de sólidos e a carga de celulases e xilanases, permitiu lograr o percentual de otimização de 80% destas variáveis em conjunto em um intervalo de confiança de -95% e +95%. Com os resultados obtidos, foi possível inferir que as melhores condições de hidrólise para produção de xarope rico em açúcares fermentáveis, foi o teor de sólidos de 12,85% (m/v), carga de celulases de 23,4$mg_{proteína}/g_{celulose}$ e carga de xilanases de 6,6$mg_{proteína}/g_{celulose}$. Tal combinação foi capaz de gerar um hidrolisado com concentração de glicose e xilose de 76,8g/L e 32,7g/L, respectivamente, totalizando 119,4g/L de açúcares totais, quando considerados celobiose, glicose, xilose e arabinose;

7. Utilizando a cepa *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em biorreator agitado mecanicamente a 150rpm, com 300mL de hidrolisado enzimático, pH 6,5, em

anaerobiose a temperatura de 37ºC foram obtidos aproximadamente 47g/L de ácido lático, o que representa eficiência fermentativa de 85,1% relacionada ao total teórico. A produtividade volumétrica máxima alcançou o valor de 1,26 g/L.h às 16 horas de processo. Os rendimentos foram de $0{,}95 g_{produto\ formado}/g_{substrato\ consumido}$, $13{,}3 g_{produto\ formado}/g_{célula\ produzida}$; e um total de $0{,}08 g_{células\ produzidas}/g_{substrato\ consumido}$;

8. O trabalho aqui apresentado sinaliza para desdobramentos, na medida em que o hidrolisado enzimático gerado, após etapa de otimização, mostrou-se altamente fermentável, com variáveis de resposta bastante interessantes quando se vislumbra aplicações tecnológicas.

Capítulo 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nestes resultados é possível traçar novas metas para estudos no âmbito da Engenharia de Produtos. As propostas realizadas ainda não haviam sido exploradas no LADEBIO ou reportadas na literatura e de fato abriu um leque de questões a serem abordadas. Desta forma, seguem algumas sugestões na intenção de aperfeiçoar os resultados e alcançar maiores concentrações de ácido lático.

1. Analisar o impacto de diferentes matérias-primas, como por exemplo, um hidrolisado a partir de polpa celulósica utilizada na primeira etapa deste trabalho, que apresentou uma eficiência de hidrólise similar ao da celulignina, biomassa lignocelulósica que teve o seu processo hidrolítico mais detalhadamente estudada;
2. Dar prosseguimento aos estudos de sinergismo, investigando o papel de proteínas acessórias que fazem parte do processo de amorfogênese da celulose;
3. Utilizar técnicas da Biologia Molecular para construir um microrganismo recombinante (geneticamente modificado) que seja capaz de metabolizar ambas as frações C5 e C6 das biomassas lignocelulósicas pré-tratadas e produzir apenas um dos isômeros de ácido lático (D- ou L- lático);
4. Explorar outros modos de operação de biorreatores a fim de se maximizar produtividade;
5. Investigar a possibilidade de recuperação de células como uma alternativa para viabilizar o processo de produção de acido lático por meio da condução em bateladas sequenciais, minimizando os custos inerentes ao preparo do inóculo;
6. Buscar procedimentos de remoção instantânea do produto do meio de bioconversão a fim de se reduzir a sua influência inibitória e possibilitar uma maior eficiência no consumo de substratos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; e SONOMOTO, K. **Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits.** Journal of biotechnology, 156(4), 286-301, 2011.

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. **Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes.** Biotechnology Advances, v.31, p. 877-902, 2013.

ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; JENNINGS, E.; ELANDER, R. **A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust**. Industrial e engineering chemistry research, 40(10), 2352-2361, 2001.

ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. **Effect of endoxylanase and α-L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4552-4558, 2011.

ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose-Experimenta and modeling studies.** *PhD* (Chemical Engineering), Technical University of Denmark (DTU), BioCentrum, 2007.

ARANTES, V; SADDLER, J. N. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** Biotechnol Biofuels, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

AWAFO, V.S.; CHAHAL, D.S.; SIMPSON, B.K; LE, G.B.B. **Production of cellulase systems by selected mutants of Trichoderma reesei in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials.** Appl Biochem Biotechnol, v. 57/58, p. 461-470, 1996.

BARNETT, J.; JERONIMIDIS, G. **Wood quality and its biological basis**. John Wiley e Sons, 2009.

BEN (2018). **Balanço Energético Nacional.** Disponível em http://epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2018. Acesso em maio de 2019.

BENEVENUTE, C. S. J. **Prospecção tecnológica da produção de ácido lático no contexto de biorrefinaria: tendências e oportunidades.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

BETANCUR, G. **Otimização do Pré-tratamento Ácido de Bagaço de Cana-deAçúcar e Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico para a Produção de Etanol de 2ª Geração.** Tese (doutorado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

BOM, E. P. S.; PEREIRA, N. J. **Tecnologia Enzimática.** ISBN 85-901104-1-9, 110p. Rio de Janeiro – Brasil, 1999.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**.**Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. **Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments.** Journal of Scientific e Industrial Research, 849-864, 2008.

CASTRO, A; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. **Química Nova,** v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CONAB 2018. **Observatório agrícola – acompanhamento da safra brasileira.** Safra 2018/19

DATTA, R. **Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives.** FEMS Microbiology Reviews 16, 221-231. 1995.

DE OLIVEIRA MORAES, A.; RAMIREZ, N. I. B.; PEREIRA, N. **Evaluation of the fermentation potential of pulp mill residue to produce D (−) lactic acid by separate hydrolysis and fermentation using Lactobacillus coryniformis subsp. torquens.** Applied biochemistry and biotechnology, 180(8), 1574-1585, 2016.

DE QUEIROZ, R.; GRASSI, P.; LAZZARE, K.; KOPPE, E.; TARTAS, B. R.; DA CUNHA KEMERICH, P. D. **Geração de energia elétrica através da energia hidráulica e seus impactos ambientais**. In Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental (Vol. 13, No. 13, pp. 2774-2784). Universidad Federal de Santa Maria, 2013.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. **Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65(4), 497-522, 2001.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. **Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts.** Applied Microbiology and Biotechnology 97 (19), 8455 - 8465, 2013.

FIBRIA. (2018). **Sustentabilidade Ambiental**. Disponível em www.fibria.com.br Acesso em março de 2018.

FIGUEIRA, S. R. F. **Panorama dos programas de biocombustíveis americano, brasileiro e europeu**. Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista, 11(2). (2015).

GHOSE, T.K**. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry**, v.59, n. 2, p. 257-268, 1987

GIANNINI, R. G. **Taxionomia do setor Sucro-Alcooleiro do Centro-Sul do Brasil - Uma Abordagem Astatística**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e

Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. **Hemicelluloses for fuel ethanol: a review.** Bioresource technology, 101(13), 4775-4800, 2010.

GOMES, F. J.; SANTOS, F. A.; COLODETTE, J. L.; DEMUNER, I. F.; BATALHA, L. A. **Literature review on biorefinery processes integrated to the pulp industry.** Natural Resources, 5(09), 419, 2014.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias láticas na fermentação alcoólica.** Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura luiz de queiroz, dissertação de mestrado, 2009.

HENRISSAT B. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochem.J**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M. **Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathways rerouting involved in food fermentation.** Current opinion in Biotechnology 10, 492-497. 1999.

IEA (2019). **Internation Energy Agency.** Disponível em https://www.iea.org/oil2019/. Acesso em maio de 2019.

JARAMILLO, L. Y. A. **Avaliação do potencial biotecnológico de linhagens de Lactobacillus sp. Visando a produção de ácido D(-) lático de segunda geração.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9.ed.: Guanabara Koogan,. pp. 3-4, 14-15, 296. Rio de Janeiro, 2013.

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Encyclopedia of Chemical Technology.** 3 ed. New York: John Willey e Sons, 1981. V.13, p. 80-90.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. **Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria.** International journal of food microbiology, 41(2), 103-125, 1998.

KOVÁCS, K**. Production of cellulolytic enzymes with Trichoderma atroviride mutants for the biomass-to-bioethanol process: cellulase production, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation**. 2009.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.** Industrial e engineering chemistry research, 48(8), 3713-3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives.** Journal of industrial microbiology e biotechnology, 35(5), 377-391, 2008.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. **Effects of cellulase and xylanase enzymes on the desconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies.** Biotechnology progress, 25(2), 302-314, 2009.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. **Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process.** The Scientific World Journal, 2014.

LEVY, S.; MACLACHLAN, G.; e STAEHELIN, L. A. **Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations.** The Plant Journal, 11(3), 373-386, 1997.

LI, Y.; CUI, F. **Microbial lactic acid production from renewable resources**. In Sustainable biotechnology (pp. 211-228). Springer, Dordrecht, 2010.

LOPES, C.R.A. **Analise da indústria de papel e celulose no Brasil.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Pós-graduação e Pesquisa em Administração, COPPEAD/UFRJ, 1998.

LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLS, R. J.; WYMAN, C. E. **Fuel ethanol from cellulosic biomass**. **Science** (Washington), 251(4999), 1318-1323, 1991.

MAEDA, R. N. **Produção de celulases por Penicillium funiculosum em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010, 197p.

MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. Seventh Edition; THOSOM BROOKS/COLE. United States; Cornell University, 2008. 1340p.

MENDEZ, J. A. **Desenvolvimento de produto enzimático e avaliação do sinergismo de proteínas acessórias para eficiente hidrólise de celulose.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicilic acid reagente for determination of reducing sugars**. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MORAES, A. O. **Bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

MOREIRA, A. L.; ALMEIDA, W. S.; SCABBIA, R. J. A.; TEIXEIRA, R. R. P. **Dosagem de ácido lático na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**. Biológico, São Paulo, 71(1), 69-76, 2009.

NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. S. **Dendroenergia: fundamentos e aplicações.** 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. v. 1. 199 p.

NOLASCO-HIPOLITO, C; MATSUNAKA, T.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. **Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L(+) lactic acid production using Lactococcuslactis IO-1 in hydrolyzed sago starch.** Journal of Bioscience and Bioengineering 93, 281-287. 2002.

NOVACANA, 2018. https://www.novacana.com/etanol/fabricacao. Acessado em 20/12/2018.

PASSOS, D. F. **Otimização do Cultivo de Penicillium funiculosum para a produção de hidrolases visando a sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

PEREIRA Jr, N; COUTO, M.A.P.G.; ANNA, L.M.M.S.B. **Biomass of lignocellulosic compostion for fuel etanol production and the context of biorefinery.** Series on Biotecnology. Biblioteca Nacional: Rio de janeiro, v.2, p. 45, 2008.

PEREIRA Jr., N. **Investigation of D-xylose fermenting yeast.** Ph.D. Thesis. Department of Chemistry.The University of Manchester, U.K, 1991.

RIOU, C.; SALMON, J.; VALIER, M.; GÜNATA, Z.; BARRE, P. **Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β-glucosidase from Aspergillus oryza.** Appl. Environ. Microbiol. v.64, p. 3607-3614. 1998.

ROCHA, V. **Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por Trichoderma harzianum visando à aplicação na produção de etanol 2G.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

ROSA, C.A.B. **Influência no teor de lignina da madeira de Eucalyptus globulus na produção e na qualidade da celulose kraft.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

ROSE, M., BABI, M., e MORAN-MIRABAL, J. **The study of cellulose structure and depolymerization through single-molecule methods.** Industrial Biotechnology, 11(1), 16-24, 2015.

SANDUN, F.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. **Biorefineries: current status, challenges, and future direction.** Energy Fuels, v. 20, n. 4, p. 1727-1737, 2006.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A; GUIMARÃES, V. M. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova**, v. 35 n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. **Microbial hemicellulases**. Current opinion in microbiology, 6(3), 219-228, 2003.

SHIBUYA, N., e IWASAKI, T. **Structural features of rice bran hemicellulose.** Phytochemistry, 24(2), 285-289, 1985.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. NREL, 2008

VALADARES, F. **Produção e uso de enzimas derivas das do fungo Pleurotus ostreatus na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico.** Dissertação (Mestrado em ciências), Escola de engenharia de Lorena, São Paulo, 2013.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I.**A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - factors affecting enzymes, conversion and synergy.** Biotechnology advances, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VASQUEZ, M.P. **Desenvolvimento de bioprocesso de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VAZ Jr. S. **Biorrefinarias: cenários e perspectivas.** Brasília, DF:Embrapa Agroenergia, 2011, 176 p.; il. color.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. **Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresource Technology**. v. 98, p. 296–301, 2007.

VIASPACE. (2018). **Biorefinary: Biofuels, Biochemical and Bioplastics.** Disponível em: http://www.viaspace.com/biochemicals_bio_plastics.php . Acesso em dezembro 2018.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. **Recent trends in the production, purification and application of lactic acid.** Chemical and biochemical engineering quarterly, 22(2), 245-264, 2008.

WEE, Y.J.; KIM, J.N.; RYU, H.W. **Biotechnological production of lactic acid and its recent applications.** Food Technology and Biotechnology 44, 163-172. 2006.

WERPY, T.; PETERSEN G. **Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I: Results of screening for potential candidates from sugar and synthesis gas.** U.S. Department of Energy. 2004.

WISCHRAL, D.; ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F.; DE FRANÇA PASSOS, D.; PEREIRA JR, N. **Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by Lactobacillus pentosus: Integrating xylose and glucose fermentation.** Biotechnology progress, 35(1), e2718, 2019.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. **Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production.** International journal of agricultural and biological engineering, 2(3), 51-68, 2009.