UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO E ULTRASSOM

JULIANA ROSEMARA FELISBERTO DA SILVA

ERECHIM, RS – BRASIL

2013

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO E ULTRASSOM

JULIANA ROSEMARA FELISBERTO DA SILVA

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

2013

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO E ULTRASSOM

JULIANA ROSEMARA FELISBERTO DA SILVA

Tese de doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

_____	_____
José Vladimir de Oliveira, D. Sc. Orientador	Helen Treichel, D.Sc. Orientadora
_____	_____
Marcio Antonio Mazutti, D. Sc. Orientador	Mónica Beatriz Alvarado Soares, D. Sc. Orientadora
_____	_____
Marcus Vinícius Tres, D. Sc. Membro	Marcelo Lanza, D.Sc. Membro
_____	_____
Rogério Marcos Dallago, D.Sc. Membro	Wagner Luiz Priamo, D. Sc. Membro

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e não mediram esforços para alcançar meus objetivos, mesmo diante das dificuldades.

Aos meus orientadores, em especial a José Vladimir de Oliveira e Marcio Antonio Mazutti, pela disponibilidade em me orientarem novamente, pela confiança depositada, e também pela disponibilidade em me ajudarem e sanarem minhas dúvidas.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, que também contribuíram com suas amizades e conversas, compartilhando seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Termodinâmica, em especial à Ilizandra Fernandes e professor Marcus Tres, por me auxiliarem com a utilização da unidade de tratamento a alta pressão. Também ao Tassio Benazzi (*in memoriam)*, pela ajuda com as preparações enzimáticas.

Às bolsistas de iniciação científica Selma Calgaroto e Keli Cantelli, pelo comprometimento e pela enorme ajuda na parte experimental.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Universidade Regional Integrada – Campus de Erechim, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pelo apoio necessário para a realização desse trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Sertão, pela realização das análises referentes à caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

"O entusiasmo é a maior força da alma. Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas".

Napoleão Bonaparte

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO E ULTRASSOM

Juliana Rosemara Felisberto da Silva

Março/2013

Orientadores: José Vladimir de Oliveira
Marcio Antonio Mazutti
Helen Treichel
Mónica Beatriz Alvarado Soares

Este trabalho teve como objetivo estudar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando gás liquefeito de petróleo (GLP) como fluido pressurizado, e ultrassom. Para tanto, primeiramente foi investigado o comportamento das enzimas celulase NS50013 e xilanase NS50030 em reações com GLP pressurizado, e também reações com a enzima com GLP pressurizado e ultrassom. Foram estudadas as variáveis pressão, tempo de reação e temperatura, utilizando para os ensaios cerca de 1mL de enzima. Foram encontradas atividades residuais de mais de 300% com pressão de 270 bar e tempo de reação de uma hora para a enzima celulase. Nos ensaios onde foi utilizada pressão menor, variando a potência do ultrassom, a atividade da enzima se manteve elevada, com valores semelhantes, utilizando-se a potência total do equipamento (154 W). Essa atividade foi corroborada com as cinéticas, que indicaram atividades concernentes às anteriores. O melhor resultado, em termos de atividade residual relativa, para a xilanase, foi de 242%, nas seguintes condições: pressão de 30 bar, 50 ºC e uma hora de exposição ao fluido pressurizado. Nos experimentos de hidrólise, foram estudadas quatro condições: com GLP pressurizado, GLP pressurizado e ultrassom, hidrólise somente utilizando ultrassom, hidrólise somente com incubação à pressão atmosférica. Foi realizado um ensaio com

hidrólise ácida do bagaço de cana, para comparação com as hidrólises enzimáticas. Para as reações com fluido pressurizado, foi estudada a influência da porcentagem de umidade contida no bagaço, porcentagem de enzima e pressão, onde o melhor resultado obtido, entre todas as reações, foi com a utilização de pressão de 200 bar, 10% de enzima e 80% de água adicionada ao bagaço, resultando em 0,2450 g de açúcar redutor total por g de bagaço seco. Esse valor corresponde a 62% de rendimento da reação de hidrólise da celulose em açúcares redutores totais, neste trabalho quantificados como glicose e xilose. A utilização do ultrassom contribuiu para uma melhor taxa de hidrólise em algumas condições, porém a condição na qual foi obtido o melhor resultado não utilizou ultrassom. Já nos experimentos realizados à pressão atmosférica, o uso do ultrassom levou a uma pequena diminuição do teor de açúcares redutores totais.

Abstract of Thesis presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Doctor in Food Engineering

ENZYMATIC HYDROLISIS OF SUGARCANE USING LIQUEFIED PETROLEUM GAS AS AND ULTRASOUND

Juliana Rosemara Felisberto da Silva
March/2013

Advisors: José Vladimir de Oliveira
Marcio Antonio Mazutti
Helen Treichel
Mónica Beatriz Alvarado Soares

This work aimed to study the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, using liquefied petroleum gas (LPG) as pressurized fluid and ultrasound. For this purpose, first it was investigated the behavior of the enzymes cellulase NS50013 and xylanase NS50030 in LPG medium, and also with coupled LPG and ultrasound. The variables studied were pressure, reaction time and temperature, using for tests about 1mL of enzyme. It was found residual activity more than 300% at 270 bar of pressure and for one hour reaction time for cellulase enzyme. In tests carried out at the lowest pressure, varying the ultrasound power the enzyme activity remained high, with similar values using the full power of the machine (154 W). This activity was supported with the kinetics, which indicated activities related to the above. The best results in terms of residual activity relative to the xylanase were 242% under the following conditions: 30 bar, 50 ° C and one hour of exposure to the pressurized fluid. In the hydrolysis experiments, four conditions were studied: pressurized LPG, pressurized LPG and ultrasound, hydrolysis using only ultrasound, hydrolysis only with incubation at atmospheric pressure. A test was conducted with acid hydrolysis of sugarcane bagasse, for comparison with the enzymatic hydrolysis. For reactions with pressurized fluid, it was investigated the influence of the moisture in the bagasse, enzyme content and pressure, where the best result among all reactions was found at 200 bar, 10%

enzyme and 80% of water added to the bagasse, resulting in 0.2450 g of total reducing sugar per g dry bagasse. This value corresponds to 62% yield of the hydrolysis of cellulose into reducing sugars, quantified in this work as glucose and xylose. The use of ultrasound contributed to a better hydrolysis rate in some conditions, but the condition in which the best result obtained was without ultrasound. In experiments at atmospheric pressure, the use of ultrasound led to a small decrease in the content of total reducing sugars.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Objetivo Geral 3
1.2 Objetivos Específicos 3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
2.1 Cana-de-açúcar 5
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar 6
2.3 Composição do material celulósico 7
2.3.1 Celulose 7
2.3.2 Hemicelulose 10
2.3.3 Lignina 11
2.4 Celulases 12
2.5 Xilanases 15
2.6 Fluidos supercríticos 17
2.7 Ultrassom 22
2.8 Hidrólise do material lignocelulósico 24
2.8.1 Hidrólise ácida 25
2.8.2 Hidrólise Enzimática 26
2.8.3 Fatores que afetam a hidrólise enzimática 27
2.8.4 Inibição da atividade da celulase 30
2.8.5 Formação de inibidores 30
2.9 Considerações acerca do estado da arte 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 33
3.1 Biomassa lignocelulósica 33
3.2 Enzima utilizada 33
3.3 Reagentes 34
3.4 Planejamento experimental 34
3.4.1 Influência de ultrassom sobre a atividade da enzima xilanase NS 50030 .34
3.4.2 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade da xilanase 35
3.4.3 Determinação da atividade enzimática da xilanase 38

3.4.4 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade de celulase 38
3.4.5 Determinação da atividade enzimática de celulase em papel filtro (FPU/mL) 40
3.4.6 Hidrólise Enzimática do Bagaço de cana-de-açúcar.....40
3.4.7 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART).....42
3.4.8 Hidrólise enzimática do bagaço de cana em sistema à pressão ambiente 43
3.4.9 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar 44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....45
4.1 Influência do ultrassom sobre a atividade da enzima xilanase NS50030.....45
4.2 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade de xilanase 49
4.3 Efeito do tratamento a alta pressão e ultrassom na atividade da celulase NS50013 53
4.4 Efeito do tratamento da enzima celulase com fluido pressurizado variando a potência do ultrassom 63
4.5 Influência do tempo de tratamento com GLP pressurizado e ultrassom na atividade da celulase.....65
4.6 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando GLP como fluido pressurizado.....67
4.7 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando GLP como fluido pressurizado combinado com ultrassom 70
4.8 Cinética de hidrólise enzimática utilizando GLP como fluido pressurizado e ultrassom 72
4.9 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar à pressão ambiente 74
4.10 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar 77
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....78
5.1 Conclusões 78
5.2 Sugestões 79
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80
ANEXO A 98
ANEXO B 103

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de glicose.....7
Figura 2.2– Estrutura linear da cadeia de celulose 7
Figura 2.3– Estrutura da xilana de bétula.....11
Figura 2.4- Representação esquemática de hidrólise da celulose para glicose através de enzimas celulolíticas.....13
Figura 2.5 – Exoglucanase.....14
Figura 3.1 - Aparato Experimental 36
Figura 3.2 – Vista geral da unidade para utilização de fluido pressurizado (a) e sistema com a célula mergulhada no banho termostático (b).....36
Figura 3.3 – Célula utilizada para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. 41
Figura 4.1 – Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase 46
Figura 4.2– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em banho ultrassônico, p<0,05, 132 W. 47
Figura 4.3 – Curva de contorno mostrando os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da xilanase na presença de ultrassom. 48
Figura 4.4– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em GLP pressurizado, p<0,05. 51
Figura 4.5– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em GLP pressurizado e ultrassom, p<0,05, 154 W. 52
Figura 4.6– Gráfico de Pareto para o tratamento da celulase NS50013 em: (a) GLP pressurizado, p<0,05; (b) GLP pressurizado e ultrassom, p<0,05, 123 W. 55
Figura 4.7– Comparação entre os dados de atividade residual relativa da enzima celulase NS50013 obtidos somente com GLP pressurizado e com a junção de ultrassom. 59
Figura 4.8- Superfície de resposta e curva de contorno, correlacionando o tempo e a pressão utilizados nos experimentos envolvendo a celulase NS50013. 62
Figura 4.9 – Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da celulase NS50013 em GLP pressurizado, combinado com ultrassom, variando sua potência e tempo, p<0,05. 64
Figura 4.10– Cinética da atividade residual relativa da enzima celulase NS50013...66

Figura 4.11– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana utilizando GLP pressurizado, p<0,1. 69
Figura 4.12– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana utilizando GLP pressurizado e ultrassom, p<0,05. 71
Figura 4.13– Cinética da hidrólise enzimática utilizando GLP como fluido pressurizado e ultrassom. 74
Figura 4.14– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana, p<0,05.. 76
Figura 4.15 – Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana, p<0,05, com ultrassom 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1– Composição percentual de alguns resíduos lignocelulósicos.....12
Tabela 2.2– Condições críticas de alguns dos solventes mais utilizados. 18
Tabela 2.3– Propriedades físicas de um gás, líquido e fluido supercrítico.....18
Tabela 3.1 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2^2 para a enzima xilanase NS50030 em banho termostático e em banho ultrassônico. 35
Tabela 3.2– Variáveis e níveis utilizados no DCC 2^3 para a enzima xilanase NS50030 em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.....37
Tabela 3.3– Variáveis e níveis utilizados no DCC 2^3 para a enzima celulase NS50013 em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.....39
Tabela 3.4–Variáveis e níveis estudados no DCC 2^2 variando a potência do ultrassom 39
Tabela 3.5 – Variáveis e níveis utilizados para o planejamento experimental da hidrólise enzimática do bagaço de cana em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.....41
Tabela 3.6 – Planejamento experimental para a hidrólise do bagaço de cana a pressão ambiente.....43
Tabela 4.1– Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da xilanase determinada em banho termostático e em banho ultrassônico.....45
Tabela 4.2- Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima xilanase NS50030 com GLP pressurizado, GLP e ultrassom (154 W) e ganho ou perda de atividade.....49
Tabela 4.3– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado, GLP pressurizado e ultrassom (123 W), e ganho ou perda de atividade em ambos os casos. 53
Tabela 4.4– ANOVA (análise de variância) para o tratamento da celulase com GLP pressurizado.....56
Tabela 4.5– ANOVA (análise de variância) para o tratamento da celulase com GLP pressurizado, combinado com ultrassom. 61
.....62

Tabela 4.6– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado, variando a potência do ultrassom e tempo. 63
Tabela 4.7– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima NS50013 com GLP pressurizado. 68
Tabela 4.8– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado e ultrassom (154 W). 70
Tabela 4.9– Valores de açúcares redutores totais para as cinéticas de hidrólise enzimática do bagaço de cana com GLP pressurizado. 73
Tabela 4.10 – Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima celulase NS50013, com a utilização de ultrassom (154 W) e sem ultrassom. 75

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, aproximadamente 46% da energia fornecida é baseada em energia renovável, com 31% dessa energia associada à utilização de biomassa. Além disso, 15,9% da energia baseada em biomassa está diretamente associada com a cana-de-açúcar e derivados. Esses números são bastante elevados quando comparados com os da matriz energética mundial, onde somente 12,9% estão associados com energia renovável (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2010).

O etanol é atualmente produzido através da conversão de carboidratos de colheitas como milho (EUA), cana-de-açúcar (Brasil) e beterraba (Europa). O etanol produzido a partir de materiais contendo açúcar e amido é considerado como etanol de primeira geração. A segunda geração de bioetanol usa resíduos de celulose como matéria-prima, pela sua relativa abundância e baixo custo. Os materiais investigados para a conversão de bioetanol de segunda geração são extensos e a maioria desses materiais é proveniente de fontes agrícolas: resíduos de safras de vegetais frescos e processados, palha de trigo, caule do milho, pastagens, e capim com alto conteúdo de xilose (GE; WANG; MOU, 2011).

O uso potencial desses resíduos é de muita importância; no Brasil a agroindústria de milho, cana-de-açúcar, arroz, mandioca, trigo, frutas cítricas, coco e capim geram 597 milhões de toneladas de resíduos por ano (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar é um abundante resíduo agroindustrial apresentando em sua composição 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000). Estima-se que, a cada ano, sobrem de 5 a 12 milhões de toneladas deste material, que corresponde a aproximadamente 30% da cana moída. As próprias usinas utilizam de 60% a 90% deste bagaço como fonte energética. Existem potencialmente usos não energéticos para o bagaço da cana, sendo que alguns deles já são viabilizados comercialmente. Merece destaque seu emprego como matéria-prima na indústria de papel e papelão, na indústria química, como material alternativo na construção civil, como ração animal e na produção de biomassa microbiana. Mesmo assim há ainda um excedente deste resíduo que não é

utilizado, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (REVISTA FAPESP, 2010).

A produção de etanol a partir de material lignocelulósico inclui o pré-tratamento da biomassa, a hidrólise da celulose, fermentação das hexoses, separação e tratamento de efluentes. Atualmente, tem-se concentrado esforços no desenvolvimento de tecnologias eficientes para a realização do pré-tratamento da biomassa, desenvolvimento de enzimas que melhoram a sacarificação da celulose/hemicelulose e o desenvolvimento de tecnologias para a fermentação simultânea das pentoses e hexoses. A tarefa de hidrolisar um material lignocelulósico para monossacarídeos fermentáveis ainda é tecnicamente problemática, pois a digestibilidade da celulose é dificultada por muitos fatores físico-químicos e estruturais. Devido a essas características estruturais, o pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção de açúcares fermentáveis na etapa de hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é quebrar a estrutura da lignina e de enfraquecer a estrutura da celulose para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a etapa de hidrólise (ALVIRA et al., 2010).

No entanto, o pré-tratamento representa um dos maiores custos no processo. Dessa forma, é de fundamental importância propor alternativas que visem à redução de etapas para que o processo se torne viável. Nesse sentido, combinar as etapas de pré-tratamento e hidrólise numa única etapa através da utilização de fluidos pressurizados pode ser uma alternativa. Com relação à hidrólise, estes fluidos podem atuar como meio reacional para o processo, aumentando a estabilidade e a atividade das enzimas (OLIVEIRA et al., 2006; KNEZ; HABULIN, 2002; MANERA et al., 2011).

A descoberta de que enzimas podem manter a atividade biocatalítica em altas pressões tem incentivado o seu uso sob condições sub e supercríticas. Na presença de uma quantidade controlada de água, necessária para a atividade da enzima, os fluidos pressurizados podem ser usados como meio de reação, e a cinética enzimática pode ser correlacionada com propriedades dos solventes, como constante dielétrica e hidrofobicidade (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007).

Neste sentido, o uso de solventes pressurizados pode ser uma alternativa interessante, não só para conduzir reações enzimáticas, mas também para melhorar a atividade de sistemas enzimáticos (ANDRADE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006; FRICKS et al., 2006).

Para a realização de reações enzimáticas a altas pressões, é necessário primeiramente avaliar o comportamento das enzimas em fluidos pressurizados, uma vez que é possível aumentar ou diminuir a atividade enzimática, dependendo da enzima, das características do solvente, do conteúdo de água da enzima/meio reacional e das variáveis do processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema sob investigação. Além da utilização de fluidos pressurizados, a utilização de ultrassom aliado ao processo pode aumentar a atividade enzimática, intensificando o tratamento enzimático de substratos à base de celulose, melhorando a transferência de massa e a difusão entre a enzima e o substrato (CONDON et al., 2009).

Considerando os aspectos relacionados ao pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos com fluidos pressurizados, verifica-se que há uma carência na literatura em relação ao assunto envolvendo as enzimas celulases e xilanases e gases de pressurização, como dióxido de carbono, mas principalmente com propano e butano. Tendo em vista essas investigações prévias, fundamenta-se a proposta desse trabalho, cujos objetivos estão descritos abaixo.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho baseia-se na avaliação do pré-tratamento e hidrólise enzimática do material lignocelulósico de bagaço de cana utilizando fluidos pressurizados, associando-os com a tecnologia de ultrassom, visando à obtenção de açúcares fermentáveis em uma única etapa.

1.2 Objetivos Específicos

Visando a necessidade de tornar mais viável a obtenção de açúcares fermentáveis a partir do bagaço de cana, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a atividade enzimática de celulase e xilanase submetida a tratamento prévio em GLP pressurizado, utilizando o planejamento de experimentos para analisar a variação de pressão, temperatura e tempo de exposição ao fluido pressurizado;

- Avaliar a atividade enzimática de celulase e xilanase submetida a tratamento prévio em GLP pressurizado simultaneamente com ultrassom, também avaliando os efeitos da variação de pressão, temperatura e tempo de exposição ao fluido pressurizado;

- Avaliar o efeito da potência do ultrassom sobre a atividade da enzima celulase;

- Verificar a influência do ultrassom sobre a xilanase, pela variação do pH e da temperatura;

-Avaliar o pré-tratamento e a hidrólise enzimática do bagaço de cana usando fluido pressurizado como meio reacional e ultrassom, estudando as cinéticas de reação;

- Com base nas informações obtidas experimentalmente, propor uma rota tecnológica para a produção de açúcares fermentáveis em uma única etapa de processamento, com a junção das etapas de pré-tratamento e hidrólise;

- Comparar o rendimento em açúcares fermentáveis para o bagaço hidrolisado usando fluido pressurizado, com outras metodologias de pré-tratamento.

A estrutura desse trabalho está apresentada da seguinte forma: no Capítulo 2 será apresentada uma revisão bibliográfica para o assunto em questão, o Capítulo 3 apresenta as metodologias analíticas e aparato experimental utilizado para a realização dos experimentos, no Capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Concluindo, o Capítulo 5 constará das conclusões e sugestões para esse trabalho, e o Capítulo 6 as referências bibliográficas utilizadas como base para a execução desta tese de doutorado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica procura abordar primeiramente os aspectos relacionados à composição do material celulósico, bem como as enzimas que o degradam. Após, será apresentado o estado da arte concernente a fluidos pressurizados e utilização de ultrassom. Por fim, uma explanação sobre pré-tratamento de compostos celulósicos seguido de sua hidrólise.

2.1 Cana-de-açúcar

A cana foi introduzida inicialmente na China, antes do início da era Cristã. Na Europa, foi introduzida pelos árabes e, com a insuficiência da produção, aliada ao descobrimento da América, a expansão das áreas cultivadas de cana-de-açúcar foi extraordinária. As primeiras mudas aqui plantadas foram trazidas da Ilha da Madeira, em 1502, e, já em 1550, os numerosos engenhos espalhados pelo litoral brasileiro produziam um açúcar de qualidade equivalente ao da Índia (BATTISTELLE et al., 2008).

As plantações de cana-de-açúcar e usinas expandiram-se rapidamente com a colonização do Brasil pelos portugueses no século 16. Devido a razões geográficas, políticas, econômicas e climáticas, a cana-de-açúcar foi inicialmente cultivada na região Nordeste. Hoje a região centro-sul é a principal produtora, e o estado de São Paulo, onde a produção de cana duplicou nos últimos 10 anos, responde por 60% da produção total de cana do Brasil (GAUDER; GRAEFF-HÖNNINGER; CLAUPEIN, 2011).

O volume de cana-de-açúcar processado até 1º de janeiro de 2012 pelas unidades produtoras da região Centro-Sul do País somou 492,23 milhões de toneladas no acumulado desde o início da safra. O total para o mesmo período da safra anterior foi de 555,39 milhões de toneladas. No mês de dezembro, a moagem somou 3,65 milhões de toneladas, 67,61% abaixo do valor registrado em dezembro de 2010 (11,27 milhões de toneladas). A produção de açúcar, acumulada desde o início da safra até o final de dezembro, atingiu 31,17 milhões de toneladas, recuo de

6,86% comparativamente a igual período de 2010. No tocante ao etanol, esta queda foi de 18,74%, com 20,56 bilhões de litros produzidos na safra de 2011/2012, dos quais 12,66 bilhões de litros de etanol hidratado e 7,90 bilhões de litros de etanol anidro (UNICA, 2012).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Materiais lignocelulósicos oriundos de diferentes resíduos têm sido utilizados para conversão em etanol. Um dos principais materiais encontrados em grandes quantidades a ser considerado, principalmente em países tropicais, é o bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo fibroso obtido após extração do caldo da cana (*Saccharum officinarum L*.) no processo de produção de açúcar (PANDEY et al., 2000). Além de ser utilizado como fonte de energia nas indústrias, o bagaço de cana tem sido utilizado como matéria-prima para produzir eletricidade, em produção de polpa e papel, e os produtos hidrolisados têm sido utilizados em diferentes processos baseados em fermentação. Uma das aplicações do bagaço de cana tem sido para a produção de alimentos enriquecidos de proteína para gado e enzimas, e produção de xilitol, um substituto da sacarose que encontra muitas aplicações na indústria (BEUKES; PLETSCHKE, 2010; PANDEY et al., 2000).

O bagaço de cana é produzido em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil, Índia, Cuba, China, México, Indonésia e Colômbia (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). No geral, uma tonelada de cana-de-açúcar gera em torno de 280 kg de bagaço. Uma parte do bagaço é queimada para produzir energia, mas grande quantidade ainda não é utilizada (CERQUEIRA; RODRIGUES; MEIRELES, 2007). As indústrias brasileiras de açúcar e álcool geram 195 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano, os quais são queimados de forma ineficiente em usinas de cogeração de energia, como uma forma de reduzir o problema do destino do bagaço. Apesar disso, ainda há um excesso de 12% que pode ser usado como matéria-prima para a produção de etanol lignocelulósico. Além disso, um aumento de 12% a 50% do excesso de bagaço tem sido previsto, devido ao aumento do rendimento das caldeiras e do sistema de produção de energia elétrica (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

2.3 Composição do material celulósico

2.3.1 Celulose

A celulose é o componente mais abundante da biomassa vegetal, é encontrada na natureza quase que exclusivamente na parede celular de plantas, embora seja produzida por alguns animais marinhos e algumas bactérias (LYND et al., 2002). É um polímero de D-glicose, onde as subunidades são linearmente unidas por ligações glicosídicas β-1,4 (β-D-glucana). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose (Fig. 2.1 e Fig. 2.2). A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (PITARELO, 2007).

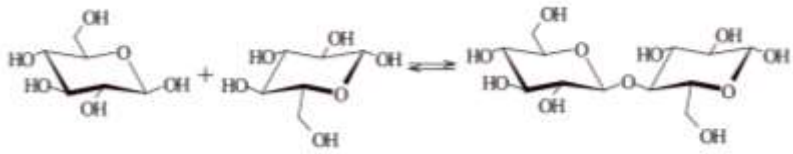


Figura 2.1- Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de glicose, produzindo celobiose (SOLOMOUNS, 1996).

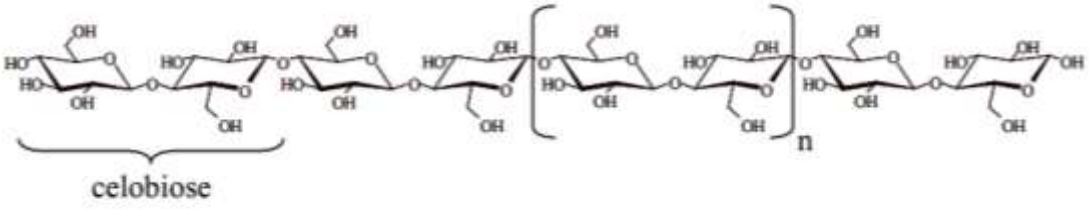


Figura 2.2– Estrutura linear da cadeia de celulose, formada por unidades de celobiose (MARTINS, 2005).

Nas plantas, a celulose consiste de partes com uma estrutura cristalina (organizada), e partes com uma estrutura amorfa (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Na estrutura cristalina, as moléculas que compõem as microfibrilas estão entrelaçadas de uma maneira suficiente para evitar penetração de pequenas moléculas de água e enzimas, através de ligações do tipo pontes de hidrogênio. Em adição às estruturas cristalina e amorfa, as fibras de celulose contêm vários tipos de irregularidades, como dobras ou torções das microfibrilas, ou espaços vazios, como microporos na superfície e capilares. Essa heterogeneidade estrutural das fibras faz com que elas sejam pelo menos parcialmente hidratadas pela água quando imersas em meio aquoso, e alguns microporos e capilares acabam permitindo a penetração de moléculas relativamente grandes, incluindo em alguns casos, as enzimas celulolíticas (LYND et al., 2002).

Devido às ligações intramoleculares de pontes de hidrogênio, a molécula de celulose apresenta uma estrutura rígida, enquanto as ligações intermoleculares de ponte de hidrogênio entre moléculas de celulose adjacentes deixa o material altamente insolúvel em água. Por esta razão, a molécula adquire uma configuração flexível mais estável, o que permite às plantas construírem caules longos com diâmetros pequenos. Simulações moleculares predizem que há oito ligações de hidrogênio por unidade na celulose cristalina, enquanto que na forma amorfa há 5,3 ligações. Esses valores explicam porque a forma amorfa da celulose é mais facilmente hidrolisada que a forma cristalina. A energia de ligação de pontes de hidrogênio entre celulose e água é de aproximadamente 25 kJ/mol. Devido a este alto valor, a celulose mostra propriedades insolúveis em água (CROCKER, 2010).

Segundo Sun e colaboradores (2004), em termos químicos, a celulose é um polímero natural linear de unidades de anidroglicose ligadas no carbono 1 e 4 por ligações β-glicosídicas. Isto é confirmado pela presença de três grupos hidroxila com acidez/reatividade diferentes, OH secundário no C-2 e C-3, e OH primário na posição do C-6, e em conformidade pela formação de várias ligações ponte de hidrogênio intra e intermoleculares. É organizada em fibrilas, as quais são rodeadas por uma matriz de lignina e hemiceluloses. Além disso, pelo uso de difração de raio X e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, quatro maiores polimorfos de celulose tem sido reportados, nomeados como celuloses I, II, III e IV. A celulose I é nativa e de estrutura predominante cristalina de algas, bactérias, alguns animais e em plantas, e pode ser convertida em outros polimorfos através de uma variedade de

tratamentos. A fibra de celulose é parcialmente cristalina, com duas formas diferentes, a celulose Iα e celulose Iβ. A celulose Iα possui estrutura triclínica e a celulose Iβ possui estrutura monoclínica, e elas diferem nas ligações de hidrogênio. Ainda, a celulose Iα é reportada como o polimorfo dominante em bactérias e algas, enquanto a celulose Iβ é predominante em plantas como algodão, madeira e bagaço. Sabe-se que a celulose Iα pode ser convertida irreversivelmente a celulose Iβ pela aplicação do calor.

A celulose II pode ser preparada por duas rotas distintas: por tratamento alcalino e regeneração (solubilização seguida de recristalização), para a formação de filmes de fibras. É a de maior relevância técnica. As celuloses III_I e III_{II} podem ser formadas a partir de celuloses I e II, respectivamente, por tratamento com amônia líquida, e a reação é reversível. As celuloses IV_I e IV_{II} podem ser obtidas pelo aquecimento das celuloses III_I e III_{II} (PARK et al., 2010).

A estrutura cristalina da celulose tem sido estudada desde sua descoberta no século 19. Atualmente, a celulose I está recebendo mais atenção devido ao seu uso potencial em produção de bioenergia. Como a estrutura da celulose não é perfeita, uma parte significante de sua estrutura é menos ordenada, essa porção é frequentemente chamada de amorfa. Um parâmetro chamado de índice de cristalinidade é utilizado para descrever a quantidade de material cristalino na celulose. Embora a maioria da celulose utilizada venha da madeira, o bagaço de cana também pode ser utilizado para esse fim. Para isso a lignina que é uma parte amorfa e que representa uma barreira para o tratamento (polpação) deve ser removida. Nesse caso a remoção das polioses (hemiceluloses) aumenta o índice de cristalinidade, o que é desejado para se obter uma polpa de boa qualidade (PARK et al., 2010).

O índice de cristalinidade (CrI) da celulose é definido como a porcentagem da parte cristalina presente na celulose total, fornece uma indicação da reatividade do substrato. A difração de raios-X (XRD) e espectroscopia RMN são geralmente utilizados para a determinação do índice de cristalinidade da celulose. A grande maioria dos métodos utilizados para medir o índice de cristalinidade está baseada em difração de raios X, pois permite que as mudanças estruturais sejam monitoradas durante tratamentos diferentes (CROCKER, 2010).

A extensão da cadeia de celulose é medida através do seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidroglicose que

formam a cadeia polissacarídica. Esse valor varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento que as fibras foram submetidas e o seu tipo de envelhecimento. Em plantas superiores, o GP da celulose varia de 10000 a 15000 unidades de anidroglicose. No entanto, todos os processos que envolvem o seu isolamento para fins industriais geram uma diminuição de uma a duas ordens de grandeza nos valores de GP (PITARELO, 2007).

2.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero natural mais abundante do mundo vegetal depois da celulose, representando cerca de 15-35% das plantas e madeiras (BIGAND et al., 2011). É uma estrutura de carboidrato complexa que consiste de diferentes polímeros como pentoses (xilose e arabinose), e hexoses (manose, glicose e galactose) (BRETHAUER; WYMAN, 2010). O componente predominante da hemicelulose de madeiras duras (*hardwood*) e plantas agrícolas, como capim e palha, é a xilana, enquanto este é a glucomanana para madeiras moles (*softwood*) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

São estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e foram depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura facilita a interação com a celulose, resultando em uma forte associação, o que dá uma grande estabilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

A hemicelulose tem um peso molecular mais baixo que a celulose, e se ramifica com cadeias laterais curtas que consistem de diferentes açúcares, os quais são polímeros facilmente hidrolisáveis. A hemicelulose serve como uma conexão entre a lignina e as fibras de celulose e dá mais rigidez a toda a rede celulose-hemicelulose-lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A solubilidade de diferentes componentes da hemicelulose aumenta com a temperatura, sendo, em ordem decrescente: manose, xilose, glicose, arabinose e galactose. A solubilização dos componentes da hemicelulose em água começa no intervalo de 150°C-180°C, não dependendo somente da temperatura, mas também de outros aspectos como umidade e pH (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A xilana é a maior constituinte da hemicelulose, encontrada largamente em angiospermas (15 a 30% da parede celular) e em gimnospermas (7 a 10 % da parede celular). É um complexo polissacarídeo composto por uma cadeia de resíduos de β-xilopiranose mantidos por ligações glicosídicas β-1,4. O grau de polimerização das xilanas é diversificado, podendo variar de 70 a 200 resíduos de β-xilopiranose, dependendo da espécie (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005). Estruturalmente, a xilana existe como uma forma de um complexo de xilana-lignina através de ligações covalentes. Esse complexo também pode se ligar com outros polissacarídeos, tais como a pectina, utilizando outras ligações químicas (OTIENO; AHRING, 2012).

A Figura 2.3 mostra a estrutura da xilana de bétula.

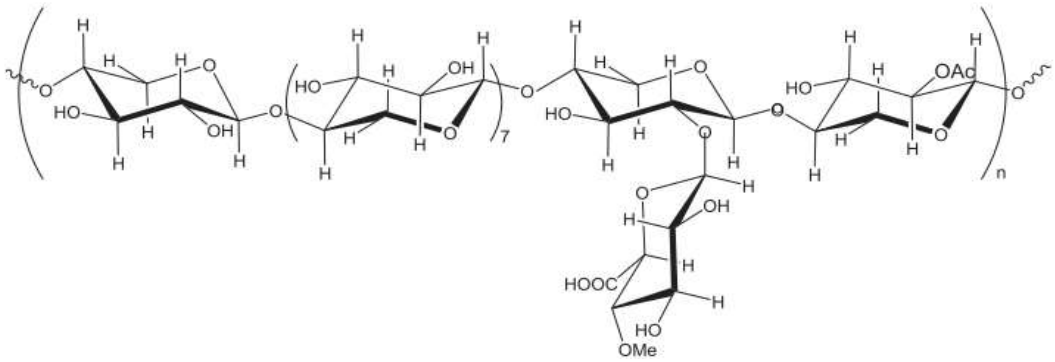


Figura 2.3– Estrutura da xilana de bétula (BIGAND et al., 2011).

Entre os resíduos agrícolas, a palha de arroz tem a maior porcentagem em peso seco de xilana, correspondente a 24,5%. Outras matérias-primas que possuem mais de 20% de xilana são a palha de milho, bagaço e palha de trigo (OTIENO; AHRING, 2012).

2.3.3 Lignina

A lignina é, depois da celulose e hemicelulose, um dos mais abundantes polímeros na natureza e está presente na parede celular. É um heteropolímero amorfo, consistindo de três unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil e álcool sinapil) que estão unidas por ligações dos tipos C-O-C e C-C. A principal função da

lignina é dar suporte estrutural à planta, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e stress oxidativo. O heteropolímero amorfo não é solúvel em água e opticamente inativo, fazendo com que a degradação da lignina seja dificultada (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A lignina possui mais ligações que a hemicelulose e celulose, formando uma barreira física ao redor dos últimos dois componentes, prevenindo a penetração de soluções e enzimas (HOWARD et al., 2003).

A Tabela 2.1 apresenta a composição de celulose, hemicelulose e lignina de alguns materiais lignocelulósicos.

Tabela 2.1– Composição percentual de alguns resíduos lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	46	27,5	26,3	Canilha et al., 2007
	32-44	27-32	19-24	Satyanarayana et al., 2007
Bambu	33-45	30	20-25	Satyanarayana et al., 2007
Palha de arroz	35	25	12	Saha, 2003
Palha de milho	40	25	17	Saha, 2003
Papel	85-99	0	0-15	Howard et al.,2003
Jornal	40-55	25-40	18-30	Howard et al., 2003
Algodão	80-95	5-20	0	Balat, 2011

2.4 Celulases

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais

glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (PEREIRA Jr; CASTRO, 2010).

As celulases são usualmente uma mistura de várias enzimas. No mínimo três principais grupos de celulases estão envolvidas no processo de hidrólise: (1) endoglucanase (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4.), a qual ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando finais de cadeia livres; (2) exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4-β-D-glucancelobiohidrolase, ou EC 3.2.1.91.), a qual degrada ainda mais a molécula pela remoção de unidades de celobiose dos finais livres da cadeia; (3) β-glucosidase (EC 3.2.1.21), que hidrolisa celobiose para produzir glicose (SUN; CHENG, 2002; GOTTSCHALK et al., 2010, BALAT, 2011).

A Figura 2.4 ilustra a atuação das celulases no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica.

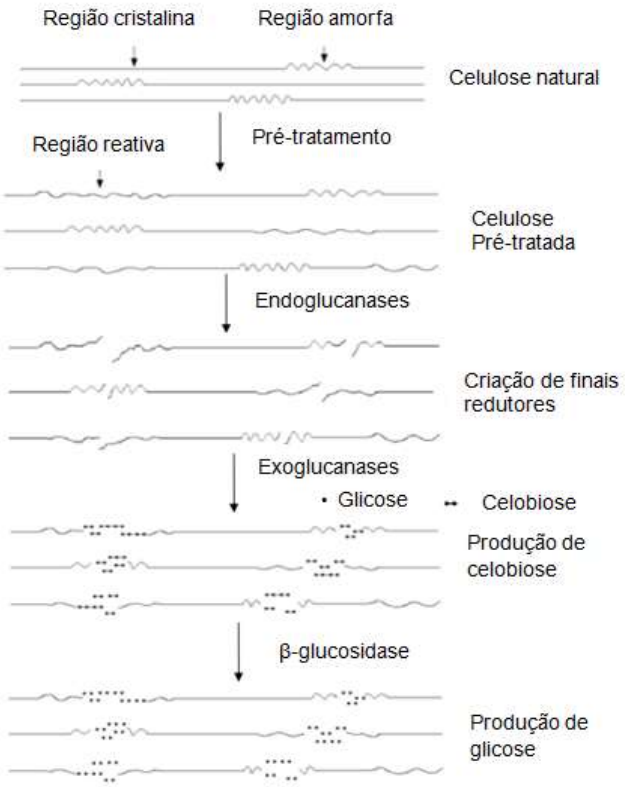


Figura 2.4- Representação esquemática de hidrólise da celulose para glicose através de enzimas celulolíticas (Taherzadeh; Karimi, 2007b, adaptado).

Todas as celulases de *Trichoderma reesei*, salvo a EG III (endoglucanase), e a maioria das celulases produzidas por outros microrganismos, compartem da mesma estrutura: dois domínios bem diferenciados unidos por um peptídeo flexível. Em um dos domínios reside a atividade catalítica (CD = *Catalytic Domain*) e no outro a capacidade da união dos carboidratos (CBM = *Carbohydrate Binding Module*). Este CBM inicialmente foi denominado de domínio de união à celulose (CBD = *Cellulose Binding Domain*), já que os primeiros CBM descritos se uniam à celulose. O CBM tem um papel importante na solubilização das zonas cristalinas da celulose nas cadeias individuais de glicana, já que desestabiliza as ligações de hidrogênio, envolvendo as cadeias mais acessíveis do domínio catalítico (RABINOVICH; MELNICK; BOLOBOVA, 2002; RABELO, 2010). A Figura 2.5 ilustra a enzima endoglucanase, bem como os domínios de atividade catalítica e sítio ativo.

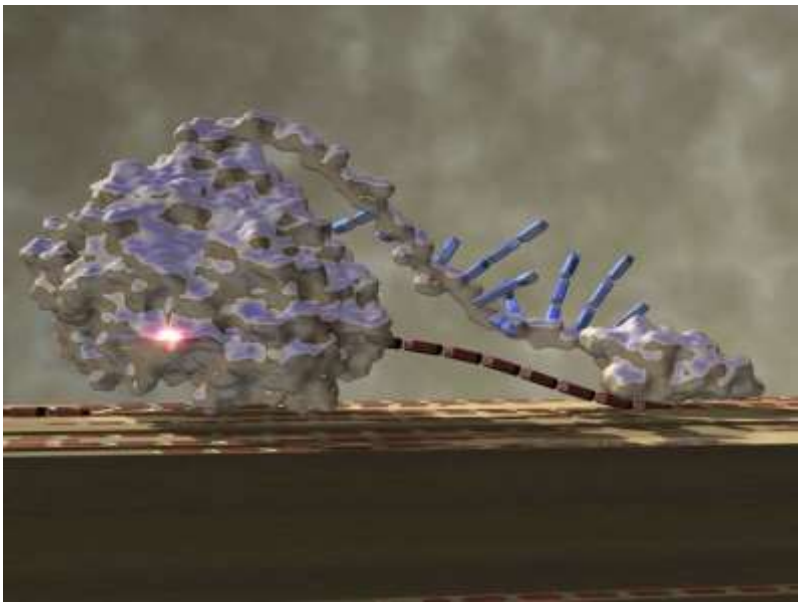


Figura 2.5 – Exoglucanase cujo domínio de ligação à direita extrai uma cadeia de celulose (CBM). No sítio ativo no domínio catalítico à esquerda (CD), a cadeia de celulose é hidrolisada, produzindo subunidades de celobiose (NREL, 2000).

As bactérias e fungos podem produzir celulases. Esses microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesofílicos ou termofílicos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium, Cellulomonas, Bacillus, Thermomonospora, Ruminococcus, Bacteriodes, Erwinia, Acetovibrio, Microbispora* e *Streptomyces* podem produzir

celulases. No entanto, pelo fato dos anaeróbios terem uma taxa de crescimento muito baixa e requererem condições de crescimento anaeróbias, a maioria das pesquisas para produção de celulase comercial foi focada em fungos (SUN; CHENG, 2002).

Os fungos filamentosos, como *Trichoderma, Penicillium* e *Aspergillus,* são bem conhecidos como produtores de celulases, xilanases e outras enzimas celulolíticas (GOTTSCHALK et al., 2010). Também se estuda a produção de enzimas celulolíticas a partir dos fungos *Acrophialophora nainiana* e *Ceratocystis paradoxa* (BARROS et al*.,* 2010). As celulases têm ampla aplicação, sendo utilizadas na clarificação de sucos, vinhos e cervejarias, ração animal, indústrias têxteis, de papel e celulose (BHAT, 2000).

2.5 Xilanases

Xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β-1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). Devido à heterogeneidade da xilana, sua hidrólise requer a ação de um sistema enzimático complexo, sendo necessária a interação de enzimas que degradem as cadeias principal e laterais. Na cadeia principal, as enzimas envolvidas são endo-β-(1,4)-xilanases, β-(1,4)-xilosidases e também as exoxilanases. As α-L-arabinofuranosidases, α-D-glucuronidases e esterases são responsáveis por degradar a cadeias laterais (CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006).

Embora a degradação completa da cadeia de xilana envolva várias enzimas, a enzima mais necessária para sua despolimerização é a endo-β-(1,4)-xilanase (EC 3.2.1.8, endoxilanase), que cliva ligações glicosídicas internas na cadeia de xilana, podendo solubilizar e degradar os seus polímeros (CUYVERS et al., 2011).

Apesar da predominância de xilana nas hemiceluloses, apenas cerca de 20-25% desta pode ser hidrolisada por xilanases. Limitações difusionais devido ao tamanho relativo dos poros pode ser um fator para explicar tal fato. Tem sido também sugerido que a distribuição heterogênea da hemicelulose pode limitar a acessibilidade da xilana à enzima. Outras razões possíveis incluem baixa suscetibilidade da xilana à hidrólise devido à sua natureza, instabilidade térmica da enzima e inibição pelo produto final (MACIEL, 2006).

A xilanase é amplamente utilizada em branqueamento na indústria de papel, facilitando a deslignificação da planta para a produção de papel de alta qualidade. Dessa forma, os agentes clareadores contendo cloro, que são um grave problema ecológico, podem ser reduzidos (SONG; WEI, 2010).

A aplicabilidade das xilanases aumenta dia a dia como na produção de rayon, celofane e diversos produtos químicos, tais como os ésteres de celulose (acetatos, nitratos, propionatos e butiratos) e éteres de celulose (carboximetilcelulose, metil e etil celulose), que são produzidos a partir de dissolução da polpa. As aplicações potenciais de xilanases incluem também a bioconversão de material lignocelulósico e resíduos agroindustriais para produtos de fermentação, clarificação de sucos, melhoria na consistência de cerveja e a digestibilidade em ração animal. A aplicação da xilanase na sacarificação de xilana em resíduos agroindustriais intensifica a necessidade de explorar seu potencial na biotecnologia (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As xilanases são encontradas em uma grande variedade de organismos vivos, incluindo bactérias marinhas e terrestres, fungos, algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos, plantas terrestres e suas sementes. No entanto, os fungos filamentosos são produtores interessantes de xilanases do ponto de vista industrial, devido ao fato de que eles excretam enzimas que degradam a xilana para o meio, eliminando a necessidade de ruptura da célula antes da purificação (POLIZELI et al., 2005). Além disso, os níveis de xilanase a partir de culturas de fungos são tipicamente muito maiores que os das leveduras ou bactérias. A maioria dos fabricantes de xilanase utilizam fermentação submersa para sua produção. Há, no entanto, um grande interesse na utilização de fermentação em estado sólido para a produção de uma grande variedade de enzimas, incluindo as xilanases de origem fúngica (CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006).

A maioria das preparações comerciais de xilanase são produzidas a partir dos fungos *Trichoderma spp* e *Aspergillus spp*. Entretanto, há estudos de produção de xilanase a partir de outros fungos, tais como: Usma-Guez et al. (2011), que estudaram sua produção a partir do fungo *Aspergillus awamori* utilizando fermentação em estado sólido, e Michelin et al. (2012), que estudaram a produção de xilanase a partir dos fungos *Aspergillus terrícola* e *Aspergillus ochraceus*. Além destes, pode-se citar os estudos envolvendo a bactéria *Lysinibacillus sp* e o fungo *Neosartorya*

spinosa (ALVES-PRADO et al., 2010), *Penicillium janczewskii* (TERRASAN et al., 2010) e leveduras (LOPES, 2010).

2.6 Fluidos supercríticos

Os fluidos supercríticos são substâncias que se encontram sob condições acima de sua pressão e temperatura críticas. No estado supercrítico, nas proximidades da região crítica, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso, apresentando densidade próxima a dos líquidos, viscosidade próxima a dos gases, difusividade duas vezes maior que a típica dos líquidos, alta compressibilidade e baixa tensão superficial (MOURA et al., 2007; BRUNNER, 2005).

Próximo do ponto crítico, pequenas mudanças na temperatura ou pressão podem levar a mudanças significativas na densidade e nas propriedades dos solventes dependentes da densidade, como o parâmetro de solubilidade, o coeficiente de partição e a constante dielétrica (PALJEVAC et al., 2007). De acordo com Penedo (2007), quando se aumenta a pressão sob temperaturas baixas, há um aumento da densidade do fluido, aproximando-se das características de um líquido, consequentemente aumentando seu poder de solvatação. A densidade de um fluido supercrítico é maior que a dos gases e muito próxima a dos líquidos. Existe um relacionamento direto entre a densidade de um fluido supercrítico e seu poder de solvatação, a qual, devido à sua alta compressibilidade, é extremamente dependente da pressão (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001).

A Tabela 2.2 contém as condições críticas de alguns solventes utilizados em reações enzimáticas. A Tabela 2.3 apresenta as características de um solvente em estado supercrítico.

Tabela 2.2– Condições críticas de alguns dos solventes mais utilizados.

Solventes Químicos	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (bar)
Dióxido de Carbono	31,1	73,76
Etano	32,3	48,83
Propano	96,7	42,45
Butano	151,9	37,97
Amônia	132,5	112,77
Água	374,0	220,48

Fonte: PENEDO (2007); REID et al. (1988).

Tabela 2.3– Propriedades físicas de um gás, líquido e fluido supercrítico.

Propriedade	Unidades	Gás	Líquido	Fluido supercrítico
Densidade	g/mL	10^{-4} - 10^{-3}	≅1	0,2 - 0,9
Difusividade	cm^2/sec	10^{-2} – 1	$<10^{-5}$	10^{-4} - 10^{-3}
Viscosidade	poise	≅10^{-4}	10^{-2}	10^{-4} - 10^{-3}

Fonte: CARRILHO, TAVARES e LANÇAS (2001).

A constatação de que algumas enzimas são estáveis e ativas em solventes orgânicos ampliou imensamente o âmbito de suas aplicações como catalisadores em síntese orgânica. No entanto, a proteção do meio ambiente exige uma redução do uso de solventes orgânicos em processos químicos, por serem compostos orgânicos voláteis. Portanto, os processos que evitem o uso de solventes orgânicos são vistos como uma contribuição valiosa para o meio ambiente. Dessa forma, as tecnologias baseadas em fluido supercrítico oferecem vantagens importantes em relação à tecnologia de solventes orgânicos, tais como a responsabilidade ambiental e facilidade de fracionamento do produto (WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010; KNEZ, 2009).

A taxa e a seletividade de reações enzimáticas em solventes orgânicos e supercríticos pode ser diretamente afetada pela força do solvente ou influenciada por

medidas indiretas da força do solvente incluindo a atividade de água e a solubilidade do substrato. A catálise enzimática em fluidos supercríticos explica a habilidade para alterar a força do solvente com pequenas mudanças na temperatura e pressão na região próxima do ponto crítico. As características versáteis dos fluidos supercríticos, a especificidade catalítica extrema das enzimas e a habilidade para alcançar completa remoção do fluido supercrítico por despressurização fazem a catálise enzimática em fluidos supercríticos atrativa para indústrias farmacêuticas e alimentícias (KNUTSON; SARKARI, 2005).

As enzimas apresentam diversas vantagens quando utilizadas em processos industriais. As reações enzimáticas podem ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, exigindo menor consumo energético e minimizando a degradação térmica dos produtos finais. Em função da seletividade enzimática é possível a obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais (MOURA et al., 2007).

A estabilidade de uma enzima pode ser alterada apenas pela mudança de pressão. Em fluido supercrítico, a enzima geralmente não é influenciada em pressões de até 300 bar. Em pressão superior a 1500 bar, pode ocorrer a inativação enzimática. Em níveis de altíssima pressão (> 4000 bar) podem ocorrer mudanças estruturais irreversíveis na enzima. No entanto, dentro da faixa típica de pressão aplicada na maioria dos estudos (100-400 bar), podem acontecer apenas algumas mudanças reversíveis na conformação. Destas, muitas não interferem com o desempenho geral da enzima. No entanto, a alta temperatura é sempre destrutiva para as enzimas (KNEZ, 2009; REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007).

Dentre os fatores que influenciam na atividade enzimática, a concentração de água é um dos mais importantes, pois as enzimas necessitam de uma quantidade específica de água ligada a elas para manter a atividade. Usualmente uma quantidade muito pequena de água é necessária para a reação em fluidos supercríticos. A água afeta a ação das enzimas, influenciando sua estrutura através de ligação não-covalente, ou pela ruptura de ligações de hidrogênio, ou facilitando a difusão de reagentes que influenciam o equilíbrio da reação (KNEZ, 2009). No entanto, não é a solubilidade de água em si, mas a partição de água entre o suporte da enzima e do solvente que influencia a estabilidade da enzima (HABULIN; PRIMOZI; KNEZ, 2005).

Em altas atividades de água, mudanças estruturais da proteína podem ocorrer e até mesmo uma pequena mudança conformacional pode ter um efeito importante sobre a atividade. O excesso de água também pode levar à aglomeração da enzima, reduzindo a área superficial disponível para a reação. Além disso, as limitações de transferência de massa também podem afetar o desempenho da enzima em níveis maiores de água (KNEZ, 2009).

A maioria das reações biocatalíticas reportadas na literatura foram realizadas com dióxido de carbono supercrítico (PALJEVAC et al., 2007; KNEZ; HABULIN, 1998; OLIVEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; FRICKS et al., 2006; WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010; LANZA et al., 2005; PRIMO, 2006). Porém surgem limitações no uso de CO_2, devido à sua não-polaridade e, portanto, a sua preferência para a dissolução de compostos hidrofóbicos. Embora a água seja necessária para a atividade enzimática em CO_2 supercrítico, a desnaturação irreversível de enzimas tem sido reportada por uma variedade de sistemas enzimáticos aquosos na presença de CO_2 pressurizado. Estudos de espectroscopia de fluorescência pressurizada *in-situ* demonstraram que a mudança na conformação da proteína de tripsina bovina aquosa é rápida (ocorrendo nos primeiros minutos de contato) e que as mudanças nos segmentos da enzima não são limitadas ao sítio ativo (KNUTSON; SARKARI, 2004). Dessa forma, tem-se buscado novas alternativas para realizar biotransformações, como a utilização de outros gases, como fluorocarbonetos, propano, butano, éter dimetílico e hexafluoreto de enxofre (KNEZ, 2009).

A utilização de gás liquefeito de petróleo (GLP) como fluido pressurizado pode ser considerado muito promissor. Esse gás é comercialmente utilizado como gás de cozinha, sendo constituído de uma mistura de propano, n-butano, isobutano, etano, além de outros gases minoritários. Isso faz esse gás ter um custo ligeiramente menor, comparado com dióxido de carbono, mas principalmente em comparação a propano e n-butano. Silva et al. (2012) observaram um aumento da atividade residual relativa de 163%, utilizando GLP como fluido supercrítico e a enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Em contrapartida, com inulinase de *Aspergillus niger*, foi obtido um aumento de 129% em sua atividade residual relativa. Johns, Smallridge e Trewhella (2001) utilizaram gás liquefeito de petróleo, a 8 bar, juntamente com levedura de panificação como catalisador, para reduzir etil

acetoacetato para (S)-3-hidroxibutirato. Nesse processo foram obtidos 74% de rendimento da reação.

Recentemente, a modelagem molecular, uma técnica computacional usada para modelar ou simular o comportamento de moléculas começou a ser utilizada. A modelagem molecular tem se tornado uma ferramenta muito importante para entender e explorar a estrutura e função das macromoléculas. O principal objetivo desse estudo teórico é criar um modelo simplificado de um sistema, a fim de reproduzir mudanças estruturais e comportamento dinâmico de um sistema. A simulação dinâmica molecular (MD) é um método computacional comumente utilizado e amplamente implementado para estudar as estruturas e propriedades das enzimas, e entender seus comportamentos em altas temperaturas (NOORBATCHA; WAESOHO; SALLEH, 2010).

Noorbatcha, Waesoho e Salleh (2012) estudaram a enzima endoglucanase nativa de *Fusarium oxysporum.* Examinaram as mudanças no comportamento dinâmico da enzima a 80 °C através da análise da derivação média da raiz quadrada (RMSD) da estrutura inicial da enzima. Os valores de RMSD das regiões helicoidais e o número de voltas da estrutura secundária (*turn)* encontram-se mais elevada em comparação com as regiões em forma de α-hélice e folha-*β*. Estes fatores podem explicar a perda de atividade da enzima em altas temperaturas. Verificou-se que as diferentes regiões da enzima se comportam de maneira diferente. O número de ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e as moléculas de água nas regiões *turn* da endoglucanase é maior. Regiões *turn* mostram maior flutuação do que as regiões α-hélice e folha-*β*. Uma contribuição importante para estas flutuações decorre de mudanças rápidas nas regiões *turn* que ligam a folha-β e os 3_{10}-hélice. Estes efeitos poderiam romper a conformação ativa da enzima, conduzindo à perda de atividade enzimática a temperaturas mais elevadas.

Embora se saiba que muitas das enzimas podem ser instáveis em condições severas de CO_2 supercrítico, estudos experimentais recentes argumentaram que as enzimas são ativas e estáveis em propano, com a mesma pressão e condição de temperatura. Mas não existem razões claras a nível molecular para a atividade e a estabilidade das enzimas em tal condição. Nesse sentido, Monhemia e Housaindokht (2012) examinaram as propriedades estruturais globais de lipase de *Candida antarctica B* (CALB) em propano, hexano, água e em CO_2 supercrítico, utilizando

simulação dinâmica molecular. Os valores de análise da derivação média da raiz quadrada (RMSD) mostram que a enzima tem uma estrutura mais semelhante à nativa. Foi observado que mutações nas regiões de entrada do sítio ativo levam à obtenção de mutantes de CALB, com aumento da atividade hidrolítica. Simulações MD mostraram que a enzima tem uma estrutura mais semelhante à nativa em propano que em CO_2 supercrítico. As estruturas secundárias da enzima permanecem intactas em propano próximo ao ponto crítico. Além disso, verificou-se que a atividade da enzima em ponto próximo ao crítico do propano pode estar relacionado com a partição de água sobre a superfície da enzima. Os resultados deste trabalho explicam como a enzima mantém-se estável em condições de alta pressão de um gás comprimido.

2.7 Ultrassom

O uso de ultrassom de baixa frequência tem recebido atenção crescente na última década para o aprimoramento de vários processos biotecnológicos. O ultrassom é definido como um som agudo acima da audição humana, que é usado para uma variedade crescente de finalidades em diversas áreas. É considerado uma “tecnologia verde”, devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, seu desempenho ser economicamente viável e devido à redução significativa no tempo de processo em comparação com outras técnicas convencionais (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

O uso de um banho ultrassônico tem vantagens, como simplicidade e baixo custo. As limitações mais evidentes são de que a frequência de operação é normalmente fixa e podem ocorrer variações de potência dentro do banho, consequentemente, a padronização dos locais de amostragem é essencial para fins comparativos (BARTON; BULLOCK; WEIR, 1996).

O funcionamento de um banho ultrassônico consiste na produção de ondas sonoras de alta frequência por um gerador de ultrassom, as quais são convertidas por um cristal piezelétrico (transdutor) em ondas mecânicas no interior do líquido, normalmente água. A propagação dessas ondas no meio reacional origina uma variação de pressão, por se movimentarem mais rapidamente que o líquido. Dessa

forma, ocorre a formação de bolhas microscópicas de ar e vapor de água, chamada de cavitação (BARBOZA; SERRA, 1992).

A formação de cavitação se dá em três fases: formação de bolhas, crescimento e violenta implosão. A implosão das bolhas produz um grande aumento da temperatura, que é dissipada no líquido. No bioprocessamento enzimático, é importante a formação de cavitação, o crescimento e colapso implosivo de bolhas no líquido. O rápido colapso das bolhas de cavitação forma forças de cisalhamento no líquido e como resultado produz uma forte agitação. Esse efeito pode aumentar significativamente a transferência de calor e massa, podendo ser útil para o carregamento dos reagentes ao sítio ativo da enzima e assim aumentar sua atividade (CONDON et al., 2009, WANG et al., 2011).

O ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência em: alta frequência e baixa potência (2-10 MHz) de ultrassom, também chamado de longo alcance ou ultrassom diagnóstico, que é usado na área médica e em análises químicas, e baixa frequência e alta potência (20-100 kHz) de ultrassom, o tipo convencional de ultrassom que é usado para limpeza. Nesse caso, as bolhas formadas possuem uma dimensão menor, o que facilita a difusão no líquido (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

Durante anos, o ultrassom tem sido utilizado em várias aplicações da biotecnologia, por exemplo, com a finalidade de rompimento celular para liberar enzimas intracelulares e organelas que são aplicadas na indústria e medicina. Outras aplicações incluem a transferência facilitada da célula para o solvente, a intensificação de transferência de massa de celulose e pectinase durante o bioprocessamento de tecidos de algodão e durante a oxidação do colesterol para colestenona por células de *Rhodococcus erythropolis.* O ultrassom mostrou influenciar a cinética da reação e reduzir o tempo de reações de esterificação (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

Barton, Bullock e Weir (1996) observaram um aumento na atividade da invertase de 37% e uma redução na inibição da hidrólise da sacarose em concentrações elevadas de substrato. As possíveis explicações para as mudanças observadas são melhorias na eficiência da mistura e rompimento de interações intra e intermoleculares com o substrato. Os autores ainda citam que o ultrassom pode ter efeito de diminuição da inibição pelo substrato.

Basto et al. (2007) observaram a descoloração de 65 - 77% de uma solução de índigo carmim, com tratamento enzimático por lacase de *Trametes villosa* estabilizada com álcool polivinílico, juntamente com ultrassom. O tratamento somente com a enzima foi capaz de descolorir 20% da solução em 1 hora de tratamento. Estes resultados têm implicações importantes para a exploração de sonicação na indústria têxtil, onde a poluição causada pelo lançamento de corantes em efluentes é uma das principais preocupações.

Wang et al. (2011) estudaram a influência do ultrassom sobre a atividade da enzima aliinase de alho fresco. Utilizando uma frequência de 40 kHz, foi obtido um aumento na atividade da enzima de 47% com a temperatura de 35 °C. O ultrassom não afetou a temperatura e pH ótimos da enzima, podendo aumentar a sua estabilidade térmica.

Souza et al. (2013) investigaram os efeitos do uso do ultrassom sobre a amilase comercial. Os resultados mostraram uma diminuição de 80% na energia de ativação, e a atividade foi três vezes maior para a temperatura de 40 °C na presença de ultrassom. Em relação ao pH, com a presença de ultrassom apresentou efeito negativo, ao passo que, com a ausência, apresentou efeito positivo na atividade da enzima.

Leaes et al. (2013) concluíram que os efeitos da irradiação ultrassônica alterou a atividade das enzimas α-amilase e amiloglucosidase. Os resultados obtidos indicaram que a atividade enzimática foi maior em temperaturas acima de 50 ºC na presença de ultrassom. Ainda, a energia de ativação de ambas as enzimas foi reduzida consideravelmente na presença de ultrassom, o que torna possível a hidrólise do amido a temperaturas baixas, como 30 ºC.

2.8 Hidrólise do material lignocelulósico

Os polímeros presentes nos materiais lignocelulósicos necessitam serem convertidos a açúcares simples antes da fermentação, através de um processo chamado hidrólise. Vários métodos têm sido descritos para a hidrólise desses materiais. Os mais comumente citados são a hidrólise ácida e enzimática. Muitos produtos podem resultar da hidrólise de material lignocelulósico. Quando a

hemicelulose é hidrolisada, os produtos normalmente liberados para o meio são xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose. A principal aplicação da xilose é para a bioconversão do xilitol, utilizado como adoçante. Contudo, a degradação de xilana produz oito produtos principais: água, metanol, ácidos fórmico, acético e propiônico, hidroxi-1-propanona, hidroxi-1-butanona e 2-furfuraldeído. Sob alta temperatura e pressão, a xilose é preferencialmente degradada à furfural, enquanto que a celulose é hidrolisada para glicose (BALAT, 2011).

2.8.1 Hidrólise ácida

Os materiais lignocelulósicos podem ser hidrolisados quimicamente pela adição de ácidos. O ácido sulfúrico é mais frequentemente utilizado, baseado no preço e toxicidade. A hidrólise ácida pode ser dividida em duas categorias: hidrólise com ácido concentrado e com ácido diluído. O processo com ácido concentrado opera a baixas temperaturas (40°C), obtendo rendimentos altos em açúcar. No entanto, o consumo de ácido é alto, embora pouca energia seja consumida para a recuperação e reciclo do ácido. Além disso, o equipamento pode sofrer corrosão e é requerido um tempo de reação de 2 a 6 horas (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

O processo com ácido diluído é conduzido sob alta temperatura e pressão, com um tempo de reação no intervalo de segundos ou minutos, o qual facilita o processo contínuo. O processo com ácido diluído envolve uma solução de aproximadamente 1% de H_2SO_4 em um reator de fluxo contínuo a alta temperatura (aproximadamente 215°C) (BALAT, 2011).

A hemicelulose é geralmente muito mais susceptível a hidrólise ácida que a celulose, podendo obter rendimentos de mais de 85% em condições relativamente brandas. Condições mais severas atingem altos rendimentos de glicose através da celulose, no entanto, levam a degradação dos açúcares da hemicelulose, por serem hidrolisados primeiramente, resultando em baixos rendimentos e produtos indesejados, que também são fortes inibidores da fermentação. Para reduzir a degradação de monossacarídeos em alta temperatura, a hidrólise com ácido diluído é tipicamente conduzida em dois estágios: o primeiro com hemicelulose solubilizada sob condições relativamente brandas, e no segundo com resíduos sólidos hidrolisados sob

as mais severas condições necessárias para decompor a celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

A hidrólise que envolve o tratamento de lignocelulose a alta temperatura sob condições ácidas leva a formação e liberação de vários compostos. Quando a hemicelulose é degradada, são formados xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose. Celulose é hidrolisada a glicose. À alta temperatura e pressão, a xilose é ainda degradada a furfural, e 5-hidroximetilfurfural (HMF) é formado a partir da degradação da manose, galactose e glicose. Ainda pode haver a formação de ácido fórmico a partir do furfural e HMF e ácido levulínico com a degradação do HMF. Da lignina são gerados os compostos fenólicos e também podem ser formados durante a degradação dos carboidratos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

2.8.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática de lignocelulose é conduzida pelas enzimas celulases, que degradam a celulose, e por enzimas que atacam a hemicelulose, como glucuronidase, acetilesterase, xilanase, β-xilosidase, galactomanase e glucomanase. Os produtos da hidrólise são usualmente açúcares redutores, incluindo a glicose e xilose (SUN; CHENG, 2002; BALAT, 2011).

A rota enzimática tem recebido grande atenção entre as diferentes alternativas tecnológicas para a hidrólise de material lignocelulósico para a produção de etanol. A principal vantagem relacionada ao uso de enzimas é a condição amena de operação, implicando numa redução da formação de produtos de degradação, o que elimina etapas subsequentes para a remoção de furfural, ácido acético e ácido levulínico (SOCCOL et al., 2010; ALVIRA et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Além disso, o uso de enzimas evita etapas posteriores de neutralização que, além de utilizar produtos químicos, consome grande quantidade de água e leva a geração de um efluente tóxico que precisa ser tratado antes da sua liberação no ambiente.

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pela hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais, o custo das enzimas têm dificultado a implantação e difusão desta tecnologia. Chen e Qiu (2010) afirmam que as celulases são responsáveis por 30% a 50% do custo total do processo. Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas

com o objetivo de reduzir o impacto do preço das enzimas no valor do etanol produzido com resultados animadores, porém ainda não plenamente satisfatórios. Para o etanol de segunda geração tornar-se economicamente viável, o custo total com as enzimas deve ficar abaixo de US$ 0,16 por litro de etanol (POLITZER; BON, 2006).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é limitada por vários fatores, como a cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área de superfície e conteúdo de lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

No caso da hidrólise enzimática da celulose, a concentração de substrato é um dos principais fatores que afeta o rendimento e taxa inicial de hidrólise. A alta concentração de substrato pode causar inibição, a qual baixa substancialmente a taxa de hidrólise. A lignina interfere na hidrólise por bloquear o acesso das celulases na celulose e por ligar irreversivelmente enzimas hidrolíticas. Em vista disso, a remoção da lignina pode aumentar consideravelmente a taxa de hidrólise (SUN; CHENG, 2002).

Vários estudos contemplam a utilização da hidrólise enzimática, tendo um aumento considerável nos últimos anos. Chen et al. (2007) realizaram hidrólise enzimática e produção de etanol utilizando espiga de milho. Gottschalk, Oliveira e Bon (2010) testaram a atuação sinérgica de celulases, xilanases, β-glucosidase e esterase de ácido ferúlico na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Aguiar (2010) estudou a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo, utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger.* Além destes, foram reportadas outras formas de hidrólise da celulose, como em água supercrítica (SASAKI et al., 1998; SAKA; UENO, 1999), ultrassom (SULAIMAN et al., 2010), e também a hidrólise enzimática de carboximetilcelulose, baseado na frequência de emissão de um sensor de ondas acústicas (HE et al., 2000).

2.8.3 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

O pré-tratamento é uma etapa necessária para alterar algumas características estruturais da lignocelulose, aumentando a acessibilidade à glucana e xilana para o ataque enzimático. Como foi mencionado, essas modificações estruturais são

altamente dependentes do tipo de pré-tratamento aplicado e tem grande efeito sobre a hidrólise enzimática e etapas subsequentes (ALVIRA et al., 2010).

Os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose em matérias-primas lignocelulósicas podem ser divididos em fatores relacionados à enzima e ao substrato, apesar de muitos deles estarem interligados durante a hidrólise (ALVIRA et al., 2010). Os fatores que afetam a hidrólise enzimática de celulose incluem substratos, atividade da celulase, e condições de reação (temperatura, pH, e outros parâmetros) (SUN; CHENG, 2002).

Foi observado que o pré-tratamento melhora a hidrólise, mas em alguns casos aumenta o índice de cristalinidade da fração celulósica. Este fato foi sugerido ser devido à remoção ou redução da celulose amorfa mais facilmente disponível após pré-tratamentos como explosão a vapor. Em contraste, pré-tratamentos com pH elevado mostraram ter menos efeito e reduzirem a cristalinidade da biomassa em alguns casos (ALVIRA et al., 2010).

O comprimento da cadeia de celulose, medido como grau de polimerização por uma variedade de métodos, é uma característica importante do material que é convertido em açúcares fermentáveis por meio de digestão enzimática. A caracterização exata do comprimento da cadeia nativa de celulose é fundamental para o estudo do desempenho da celulase, em particular no caso de exo-celulases (HUBBEL; RAGAUSKAS, 2010).

O grau de polimerização está essencialmente relacionado com outras características do substrato, como a cristalinidade. Embora o papel do comprimento da cadeia de glucana não seja definitivamente conhecido, acredita-se afetar a hidrólise da celulose. A despolimerização depende da natureza do substrato. Na hidrólise enzimática, as endoglucanases clivam os locais internos das cadeias de celulose, de preferência a menos ordenada, sendo a principal responsável pela redução do grau de polimerização de substratos celulósicos. No entanto, independentemente do substrato a ser atacado, parece haver um "nivelamento" do GP da celulose, correlacionado com o aumento da recalcitrância da celulose cristalina residual (ALVIRA et al., 2010).

Substratos

A concentração de substrato é um dos principais fatores que afeta o rendimento e taxa inicial de hidrólise enzimática de celulose. A baixos níveis de substrato, um aumento da concentração deste geralmente resulta em um aumento do rendimento e taxa da reação de hidrólise. No entanto, a alta concentração de substrato pode causar inibição, a qual baixa substancialmente a taxa de hidrólise, e o grau de inibição pelo substrato depende da razão do substrato total e enzima total (SUN; CHENG, 2002).

A susceptibilidade de substratos celulósicos para celulases depende das características estruturais do substrato incluindo cristalinidade de celulose, grau de polimerização da celulose, área de superfície, e conteúdo de lignina (SUN; CHENG, 2002; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A lignina interfere na hidrólise por bloquear o acesso das celulases na celulose e por ligar irreversivelmente enzimas hidrolíticas. Em vista disso, a remoção da lignina pode aumentar consideravelmente a taxa de hidrólise (SUN; CHENG, 2002). Já a remoção da hemicelulose aumenta o tamanho do poro do substrato, aumentando assim a acessibilidade e a probabilidade de hidrólise da celulose (ALVIRA et al., 2010).

Celulase

Aumentar a dosagem de celulase no processo pode aumentar o rendimento e taxa de hidrólise, mas aumentaria significativamente o custo do processo. A concentração de celulase na hidrólise varia de 7 a 33 FPU/g de substrato, dependendo do tipo e concentração de substrato. A hidrólise enzimática da celulose consiste de três etapas: adsorção da celulase sobre a superfície da celulose, a biodegradação da celulose para açúcares fermentáveis, e desorção de celulase. A atividade da celulase diminui durante a hidrólise. A adsorção irreversível de celulase sobre a celulose é parcialmente responsável por esta desativação. A adição de surfactantes durante a hidrólise é capaz de modificar a superfície da celulose e minimizar a ligação irreversível da celulase sobre a celulose. As celulases podem ser recuperadas do líquido sobrenadante ou resíduos sólidos, e a maioria das celulases recuperadas são

do líquido sobrenadante. A recuperação da enzima pode aumentar efetivamente a taxa e o rendimento da hidrólise e baixar o custo da enzima (SUN; CHENG, 2002).

2.8.4 Inibição da atividade da celulase

A atividade da celulase é inibida pela celobiose, e, em menor grau, pela glicose. Vários métodos foram desenvolvidos para reduzir a inibição, incluindo o uso de altas concentrações de enzimas, o suplemento de β-glucosidases durante a hidrólise, e a remoção de açúcares durante a hidrólise por ultrafiltração ou sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Neste, os açúcares redutores produzidos na hidrólise da celulose são simultaneamente fermentados a etanol, o qual reduz extremamente a inibição do produto na hidrólise (SUN; CHENG, 2002).

A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) é uma forma de evitar a inibição enzimática, uma vez que à medida que a glicose está sendo formada, também está sendo consumida para a produção de etanol, levando a uma maior conversão de celulose. Um processo em SSF requer uma condição intermediária de temperatura para as enzimas e para a levedura adicionada, uma vez que a temperatura ótima para a sacarificação é cerca de 55 °C e 30 °C para a fermentação (SANTOS; SOUTO-MAIOR; GOUVEIA, 2010). A vantagem da sacarificação e fermentação separadas (SHF) é a habilidade de conduzir cada etapa sob condições ótimas, tais como hidrólise enzimática a 45-50 °C e fermentação em cerca de 30 °C. É possível também realizar a fermentação em modo contínuo, com reciclo de células. A maior desvantagem de SHF é inibir os açúcares liberados durante a hidrólise (GALBE; ZACCHI, 2002).

2.8.5 Formação de inibidores

Durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos, uma série de compostos os quais são inibitórios a microrganismos são formados ou liberados. Baseados em sua origem, os inibidores são usualmente divididos em três grandes grupos: ácidos fracos, derivados do anel furano, e compostos fenólicos. Estes compostos limitam a utilização eficiente dos hidrolisados para a produção de etanol por fermentação. Se os inibidores

são identificados e os mecanismos de inibição elucidados, a fermentação pode ser melhorada através do desenvolvimento de métodos de desintoxicação específicos, escolher o microrganismo adaptado ou otimizar a fermentação (PALMQVST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Muitos métodos de desintoxicação como neutralização, calagem com hidróxido de cálcio, carvão ativado, resinas de troca iônica e de desintoxicação enzimática usando lacase são conhecidos para a remoção de vários compostos inibidores a partir de hidrolisados lignocelulósicos (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Desde que os inibidores nos hidrolisados celulósicos são identificados, o processo de fermentação pode ser melhorada de várias formas. A formação de inibidores pode ser minimizada através da otimização do pré-tratamento e das condições de hidrólise. Podem ser desenvolvidos métodos de desintoxicação específicos para a remoção eficiente de inibidores antes da fermentação dos hidrolisados. Uma melhor compreensão dos mecanismos de inibição dos compostos e de seus efeitos de interação, bem como a influência dos parâmetros ambientais tais como pH, permitirá a otimização das condições durante a fermentação. Devem também ser consideradas a taxa de bioconversão e a resposta adaptativa do microrganismo para os compostos tóxicos no hidrolisado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

2.9 Considerações acerca do estado da arte

Nesta revisão bibliográfica, procurou-se relatar o estado da arte acerca da obtenção de açúcares fermentáveis a partir de materiais lignocelulósicos, com a utilização de novas tecnologias, como é o caso da utilização de fluidos pressurizados e a tecnologia de ultrassom. O Brasil é o maior produtor de etanol, obtido a partir de cana-de-açúcar, planta que apresenta os maiores rendimentos de produção desse biocombustível. A obtenção de bioetanol a partir do bagaço da cana é uma forma de aumentar sua produção sem aumentar a fronteira agrícola, além de gerar menos resíduos, o que é satisfatório para o meio ambiente.

A etapa de hidrólise utilizando catalisadores biológicos é bastante utilizada. No entanto, é necessário um pré-tratamento da biomassa para deixá-la acessível para as

enzimas hidrolisarem a celulose em açúcares fermentáveis. Grande parte dos trabalhos reportados na literatura apresenta essas duas etapas separadas. Uma junção dessas etapas seria interessante, pois o que se busca é um processo para a produção de etanol de segunda geração que seja viável economicamente.

Particularmente, no que se refere ao emprego de GLP pressurizado como agente modificador das enzimas aqui investigadas, não se encontrou nenhum estudo a este respeito na literatura.

Diante da carência de dados na literatura, surgiu a proposta para esse trabalho, que é a junção do pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica a alta pressão, utilizando fluidos pressurizados, visando a obtenção de açúcares fermentáveis para produção de etanol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os materiais e metodologias utilizadas para a realização dos experimentos com a enzima celulase em meio pressurizado, bem como para mensuração de sua atividade.

3.1 Biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido em uma agroindústria do município de Marcelino Ramos/RS, o mesmo foi passado em peneira de 16 mesh (1,0 mm/µm) para a retirada das partículas maiores, ou seja, parte da lignina existente, e acondicionado em lugar ao abrigo da luz e umidade.

Após foi realizada a análise da composição química do bagaço de cana-de-açúcar, segundo metodologia descrita no Anexo A – Determinação da Composição Química por Van Soest (RABELO, 2010).

3.2 Enzima utilizada

Foram utilizadas nesse estudo o complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (NS50013) e a enzima endo-xilanase (NS50030), gentilmente cedidas pela Novozymes Latin America Ltda (Brasil). O complexo celulolítico catalisa a quebra do material celulósico em glicose e celobiose, podendo ser utilizado para a redução de viscosidade ou aumentar o rendimento de extração de produtos de origem vegetal. Os principais produtos da reação de hidrólise da celulose com NS50013 são a celobiose e a glicose. Já a endo-xilanase é um kit destinado à conversão de materiais lignocelulósicos.

3.3 Reagentes

O GLP (gás liquefeito de petróleo) utilizado como fluido pressurizado foi fornecido pela Petrobras e é constituído por uma mistura de propano (50,3%), n-butano (28,4%), isobutano (13,7%), etano (4,8%) e outros componentes minoritários (metano, pentano, isopentano, etc.). A xilana de bétula, D-glicose e D-xilose foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.4 Planejamento experimental

3.4.1 Influência de ultrassom sobre a atividade da enzima xilanase NS 50030

Os experimentos foram realizados em um banho ultrassônico (USC - 1800A, UNIQUE, Brasil), equipado com um transdutor com vibrações longitudinais. O banho ultrassônico tem uma frequência de funcionamento de 40 kHz e uma potência máxima de 132 W. O transdutor de ultrassom (área de superfície de 282,2 cm^2) é montado no fundo do banho na horizontal ao longo do comprimento do banho.

Foram avaliados os efeitos da temperatura e do pH da solução tampão sobre a atividade da xilanase. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar os efeitos da temperatura e do pH, baseados no intervalo de temperatura e pH ótimos da enzima, de 35 a 60 °C e 5,2 a 8,0, respectivamente, de acordo com a Tabela 3.1. Os efeitos do ultrassom na atividade foram avaliados através da determinação da atividade da xilanase na presença e ausência de irradiação ultrassônica, buscando-se saber se o ultrassom aumenta ou diminui a atividade da enzima durante o processo. Os resultados serão apresentados na forma de ganho ou perda de atividade (Equação 1). Todos os resultados foram analisados através do programa Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 3.1 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2^2 para a enzima xilanase NS50030 em banho termostático e em banho ultrassônico.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	5,2	5,6	6,6	7,6	8
Temperatura (°C)	35	39	47	56	60

$$Ganho\ ou\ perda\ de\ atividade = \frac{(Atividade\ ultrassom - Atividade\ banho\ termostático)}{Atividade\ banho\ termostático} * 100 \quad (1)$$

3.4.2 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade da xilanase

Os experimentos com GLP pressurizado, simultaneamente com ultrassom, foram realizados na unidade para tratamento enzimático com fluido pressurizado e ultrassom. A unidade utilizada nesse trabalho consiste basicamente de um reservatório de solvente, um banho termostático (Nova Ética), um banho ultrassônico (USC - 1800A, UNIQUE), com frequência ultrassônica de 40 kHz e potência ultrassônica total de 154 W (correspondente a 100% da potência), uma bomba de seringa (ISCO 260D), uma célula de aço inoxidável com um volume interno de 1mL, um transdutor de pressão (Smar, LD301) equipado com um indicador (Smar, HT201).As linhas experimentais empregaram tubulações com diâmetro externo de 1/16" de aço inoxidável (HIP) e entre a bomba e o reservatório de solvente há uma "*checkvalve*" (HIP 15-41AF1-T 316SS), para evitar o refluxo do solvente pressurizado. O diagrama esquemático do aparato experimental é apresentado na Figura 3.1, e na Figura 3.2 é apresentada a vista geral da unidade, bem como o sistema com a célula mergulhada no banho termostático.

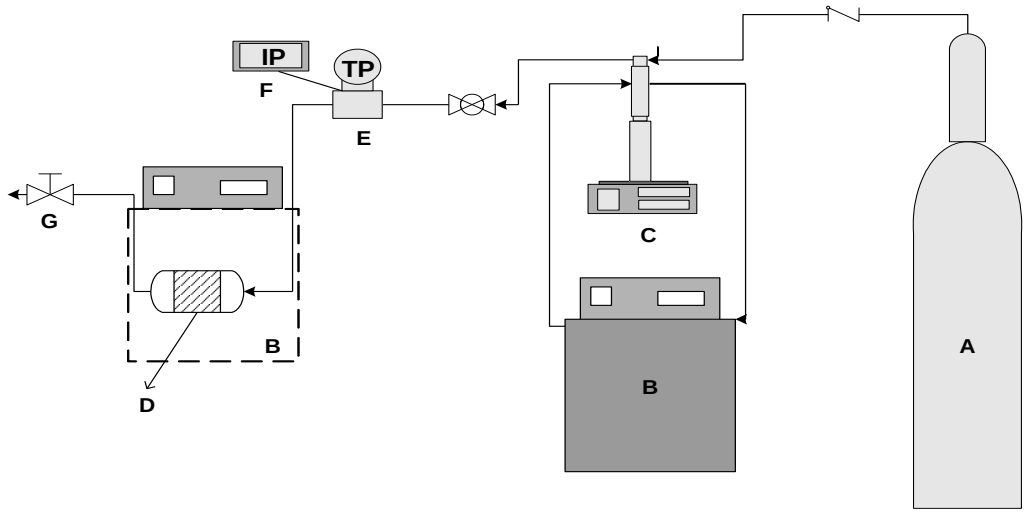


Figura 3.1 - Aparato Experimental - A unidade experimental consiste de: cilindro de GLP (A), banhos termostáticos (B), bomba seringa de alta pressão (C), célula (D), transdutor de pressão (E), indicador de pressão (F), válvula micrométrica (G).

(a) (b)

Figura 3.2 – Vista geral da unidade para utilização de fluido pressurizado (a) e sistema com a célula mergulhada no banho termostático (b).

O extrato bruto enzimático foi diluído em tampão fosfato de sódio pH 5.3, na proporção de 1:10 (v/v), e cerca de 1mL desta diluição foi colocada na célula com ajuda de uma seringa e mergulhada no banho com a temperatura estabelecida pelo planejamento de experimentos. Nos experimentos que utilizavam ultrassom, essa função era acionada, nos outros experimentos o banho ultrassônico era utilizado

também com a função de banho termostático. Após esta etapa, o sistema foi pressurizado e mantido à pressão e temperatura constantes pelo tempo de exposição pré-estabelecido. O tempo necessário para o alcance da pressão de operação e estabilização do fluxo na bomba de seringa era de cerca de 5 minutos. Com a estabilização do sistema, era iniciada a contagem do tempo de exposição ao fluido pressurizado.

Ao término da reação, iniciava-se o processo de despressurização, que foi mantido a 10 bar/min para todos os experimentos. Após, a célula era desconectada e a enzima retirada. A quantidade exata de enzima retirada da célula era obtida gravimetricamente, e após sabendo-se o peso e a densidade da enzima chegava-se ao volume final, que era utilizado para a análise de atividade enzimática. A atividade da enzima foi determinada antes (atividade inicial) e depois (atividade final) do processo de tratamento com fluido pressurizado.

Foi realizado um delineamento composto central 2^3, para avaliar os efeitos da pressão, temperatura e tempo de exposição ao fluido sobre a atividade da xilanase, na presença e na ausência de irradiação ultrassônica, conforme a Tabela 3.2. As variáveis foram estudadas nesses intervalos devido a estudos anteriores e às características da bomba seringa de alta pressão.

Tabela 3.2– Variáveis e níveis utilizados no DCC 2^3 para a enzima xilanase NS50030 em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	50	65	80
Pressão (bar)	30	150	270
Tempo (h)	1,0	3,5	6,0

3.4.3 Determinação da atividade enzimática da xilanase

A atividade da xilanase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Lopes et al. (2011), que consiste na adição da enzima em uma solução de xilana de bétula 1%, dissolvida em tampão fosfato de sódio pH 5.3. Os tubos foram deixados em banho-maria à temperatura de 50 °C por 5 minutos. Após o término da reação, procedeu-se a determinação dos açúcares redutores totais, que se baseia no método proposto por Miller (1959), com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Esse método consiste em pipetar 0,5 mL da amostra e adicionar a mesma quantidade de DNS em um tubo de ensaio. A seguir, o tubo é levado ao banho-maria, em água fervente, por 5 minutos. Após a amostra é resfriada em banho de gelo e adicionado 8mL de tartarato de sódio e potássio 0,05 M. Por último é feita a leitura das amostras em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS) a 540 nm. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de açúcar redutor (D-xilose) por minuto a 50 ºC. A atividade será expressa em termos de atividade residual relativa, para verificar o efeito dos tratamentos com ultrassom e fluido pressurizado, de acordo com a Equação 2:

$$Atividade\ Residual\ Relativa = \frac{Atividade\ após\ tratamento}{Atividade\ antes\ do\ tratamento} * 100 \quad (2)$$

3.4.4 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade de celulase

Para avaliar o efeito da temperatura, pressão e tempo de exposição do fluido pressurizado sobre a enzima celulase, foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^3. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). A Tabela 3.3 apresenta os níveis utilizados, bem como os intervalos de temperatura, pressão e tempo de exposição ao fluido pressurizado. O mesmo planejamento foi utilizado para a avaliação da atividade da enzima, utilizando tratamento com fluido pressurizado combinado com ultrassom, com potência equivalente a 80% da potência total do equipamento (123 W). Os experimentos foram realizados da mesma forma que a enzima xilanase, utilizando o

aparato experimental da Figura 3.2, e o mesmo procedimento citado anteriormente (item 3.3.2). O extrato bruto enzimático foi diluído em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5.5, na proporção de 1:10 (v/v) para a execução dos experimentos, e os intervalos estudados de temperatura, pressão e tempo de reação foram baseados em trabalhos anteriores, características da enzima e capacidade da bomba seringa de alta pressão.

Tabela 3.3– Variáveis e níveis utilizados no DCC 2^3 para a enzima celulase NS50013 em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40,0	47,0	54,0
Pressão (bar)	30	150	270
Tempo (h)	1,0	3,5	6,0

Após a execução dos experimentos de acordo com a Tabela 3.3, um novo planejamento foi conduzido, a fim de estudar o efeito da variação da potência do ultrassom e o tempo sobre a atividade da enzima celulase. A temperatura e pressão foram fixadas no ponto central (47 °C e 150 bar). O intervalo de variação do tempo foi de 10 a 60 minutos. Já a potência do ultrassom variou de 31 W a 154 W. Dessa forma, foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^2, conforme a Tabela 3.4.

Tabela 3.4–Variáveis e níveis estudados no DCC 2^2 variando a potência do ultrassom e o tempo da exposição ao fluido.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Potência do ultrassom (W)	31	92	154
Tempo (min)	10	35	60

3.4.5 Determinação da atividade enzimática de celulase em papel filtro (FPU/mL)

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Mandels (1976). Foi adicionado 50 mg de papel filtro (Whatman, nº1) em tubos de ensaio, com a enzima celulase antes do tratamento e após o tratamento. Após, adicionou-se 2mL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 (BALSAN et al., 2012). Os tubos foram deixados em banho-maria à temperatura de 50 °C por 60 minutos. Após o término da reação, procedeu-se a determinação dos açúcares redutores totais, que se baseia no método proposto por Miller (1959), com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Uma unidade de celulase é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1µmol de açúcar redutor por minuto, ou seja, U = $\mu mol.min^{-1}$. A atividade foi expressa em termos volumétricos ($U.mL^{-1}$).

Para se determinar a concentração de açúcares redutores presentes nas amostras, construiu-se a curva de calibração utilizando glicose como açúcar redutor, nas concentrações entre 0,3 a 3 g/L.

A atividade enzimática da celulase será expressa em termos de atividade residual relativa, para verificar o efeito do tratamento com fluido pressurizado e fluido pressurizado juntamente com ultrassom, que consiste na razão entre a atividade após o tratamento e antes do tratamento, de acordo com a Equação 1 (Item 3.3.3).

3.4.6 Hidrólise Enzimática do Bagaço de cana-de-açúcar

Para conduzir os experimentos de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, foi utilizada a mesma unidade para tratamento da enzima em fluido pressurizado e em ultrassom (Fig. 3.1 e 3.2-a), apenas foi utilizada uma célula com volume interno de 30 mL em substituição à célula de 1mL (Fig. 3.3).

Figura 3.3 – Célula utilizada para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Para os próximos ensaios, foi mantida a temperatura ótima dos experimentos anteriores, que foi de 47 °C, tempo de exposição de 4 horas e potência ultrassônica de 154 W. Foram variadas a porcentagem de enzima e de umidade, com relação à quantidade de bagaço de cana, e a pressão do sistema. Os cálculos da porcentagem de água e de enzima utilizadas foram realizados por meio de fração mássica. Para tanto dois delineamentos composto central 2^3 foram realizados, para ensaios utilizando a potência do ultrassom, e sem a utilização do ultrassom, totalizando dessa forma 22 experimentos (Tabela 3.5). Da mesma forma, nas condições com maior rendimento de hidrólise da celulose em glicose, foram realizadas cinéticas para avaliar o comportamento da hidrólise.

Tabela 3.5 – Variáveis e níveis utilizados para o planejamento experimental da hidrólise enzimática do bagaço de cana em GLP pressurizado e em GLP pressurizado combinado com ultrassom.

Variáveis	*Níveis*		
	-1	*0*	*+1*
Enzima (%)	2	6	10
Umidade (%)	40	60	80
Pressão (bar)	50	125	200

Para a realização dos próximos experimentos, primeiramente foi realizada a correção de umidade do bagaço. Foi calculada, através de fração mássica, a quantidade de água que deveria ser adicionada ao bagaço para estar de acordo com a umidade que seria estudada, ou seja, de 40 a 80%. Dessa forma, foi adicionada a quantidade de água referente a cada umidade em amostras de 10 gramas de bagaço de cana, e as amostras foram levadas à estufa a 105 ºC por 24 horas, para, por gravimetria, chegar à umidade real do bagaço.

Cálculo da umidade do bagaço de cana:

$$Umidade = \frac{(peso\ béquer + peso\ bagaço + peso\ água) - (peso\ após\ estufa)}{(peso\ bagaço + peso\ água)} * 100 \quad (3)$$

O procedimento para realização dos experimentos baseou-se em primeiramente pesar a água (para adição de umidade do bagaço), após a enzima, para que houvesse solubilização entre a enzima e a água, e por último o bagaço de cana. Após alguns minutos, a mistura era adicionada na célula, e conectada à unidade. Após o sistema era submetido à elevação de pressão; decorrido o tempo da reação, o sistema era despressurizado e após a célula era desconectada, onde procedia à determinação de açúcares redutores totais.

3.4.7 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Após o procedimento a alta pressão, os açúcares redutores totais do bagaço de cana foram extraídos utilizando 100 mL de água destilada, adicionados à amostra. Essa mistura era levada à incubação, por 20 minutos a uma temperatura de 40 °C (MAZUTTI et al., 2010). Após esse período, a amostra era filtrada utilizando-se papel filtro qualitativo Whatman nº 1, feita aferição a 100 mL, e preparada para leitura de ART no espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS), de acordo com Miller (1959). As amostras eram preparadas em duplicata e a leitura era realizada também em duplicata.

Como o método quantifica açúcares redutores totais, podem ser quantificados glicose e xilose. Dessa forma, os resultados serão expressos em ART/g de bagaço, que inclui glicose e xilose.

O cálculo de ART (Eq. 4) leva em consideração a curva de calibração do espectrofotômetro (valor 2,4109), a absorbância medida em 540 nm, e quantidade de água destilada utilizada para a extração dos açúcares do bagaço de cana (100 mL de água destilada), utilizando 2 gramas de bagaço de cana. Como após o experimento o bagaço não foi seco em estufa, foram feitas pequenas alterações nos cálculos levando em consideração a umidade do bagaço de cana.

$$ART\ (g/g\ bagaço) = \ 2{,}4109 * abs * \left(\frac{0{,}1}{2}\right) \quad (4)$$

3.4.8 Hidrólise enzimática do bagaço de cana em sistema à pressão ambiente

Nesse procedimento foi utilizado apenas o banho ultrassônico, com (154 W) e sem a utilização de potência. Foram utilizadas as mesmas condições do planejamento utilizando GLP pressurizado. Dessa forma, foram estudadas a porcentagem de enzima e água utilizadas nos ensaios, mantendo-se a mesma temperatura (47 °C) e tempo de 4 horas de reação, de acordo com o planejamento 2^2 (Tabela 3.6). As amostras de 2 gramas de bagaço de cana, juntamente com a água e a enzima foram colocadas em erlenmeyers que foram mergulhados no banho ultrassônico. Após esse procedimento, foi realizada a extração do açúcar conforme item 3.3.7.

Tabela 3.6 – Planejamento experimental para a hidrólise do bagaço de cana a pressão ambiente.

Variáveis	*Níveis*		
	-1	*0*	*+1*
Enzima (%)	2	6	10
Umidade (%)	40	60	80

3.4.9 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar

Para comparação com a hidrólise enzimática, foi realizada uma hidrólise ácida, utilizando a mesma quantia de bagaço de cana-de-açúcar (2 gramas), adicionando 100 mL de ácido clorídrico 2 M. A mistura foi levada ao banho fervente por 20 minutos. Após a mistura foi filtrada e neutralizada com NaOH 2 M até pH 6. A leitura de ART da amostra foi realizada conforme procedimento citado anteriormente, de acordo com Miller (1959).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos e também uma discussão sobre o assunto, baseada em dados reportados na literatura.

4.1 Influência do ultrassom sobre a atividade da enzima xilanase NS50030

A Tabela 4.1 apresenta os resultados relativos à atividade da xilanase em função do pH e temperatura, na presença e ausência de irradiação ultrassônica.

Tabela 4.1– Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da xilanase determinada em banho termostático e em banho ultrassônico.

Experimento	pH	T (ºC)	Atividade banho termostático (U/mL)	Atividade banho ultrassônico (U/mL)	Ganho/perda de atividade (%)
1	5,6 (-1)	39 (-1)	18,25	40,27	120,70
2	7,6 (1)	39 (-1)	15,50	39,11	152,29
3	5,6 (-1)	56 (1)	24,74	3,43	-86,12
4	7,6 (1)	56 (1)	25,32	6,02	-76,24
5	5,2 (-1,41)	47 (0)	21,83	53,23	143,80
6	8,0 (1,41)	47 (0)	19,55	40,27	105,93
7	6,6 (0)	35 (-1,41)	16,22	2,70	-83,36
8	6,6 (0)	60 (1,41)	26,28	2,51	-90,46
9	6,6 (0)	47 (0)	21,50	51,45	139,28
10	6,6 (0)	47 (0)	22,01	48,41	119,91
11	6,6 (0)	47 (0)	20,31	45,67	124,82

De acordo com a Tabela 4.1, a condição na qual foi obtida o maior ganho de atividade foi o experimento 2, com temperatura de 39 ºC e pH de 7,6. Porém o ganho de atividade foi alto nos experimentos à temperatura de 39 ºC (experimentos 1 e 2) e 47 ºC (experimentos 5, 6, 9 e 10), independentemente do pH utilizado. Os resultados desses experimentos indicam que a atividade da xilanase aumentou consideravelmente utilizando ultrassom em condições específicas.

Através da Tabela 4.1, percebe-se também que a enzima responde de forma diferenciada às variações nas variáveis independentes (temperatura e pH). Para verificar a influência do ultrassom sobre a atividade, os dados da Tabela 4.1 foram utilizados para avaliar os efeitos de interação e quadráticos das variáveis independentes.

A Figura 4.1 mostra os efeitos calculados para a atividade determinada na ausência de ultrassom. A temperatura apresentou efeito positivo ($p<0,05$), enquanto o pH apresentou efeito negativo sobre a atividade, sendo significativo estatisticamente ($p<0,05$). Entre os efeitos, a temperatura foi o mais pronunciado, indicando que o seu aumento levou a uma atividade de xilanase mais elevada.

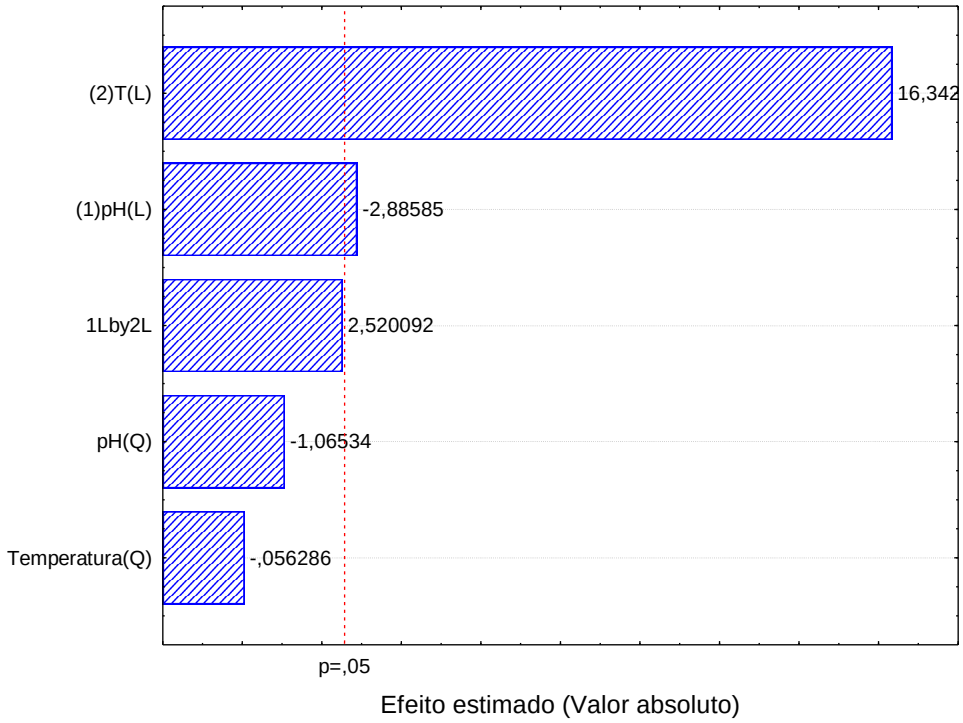


Figura 4.1 – Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em banho termostático, $p<0,05$, 132 W.

A Figura 4.2 mostra os efeitos para a atividade determinada na presença de ultrassom. Nesse caso, apenas o efeito da temperatura foi significativo estatisticamente (p<0,05), apresentando valor negativo, indicando que a diminuição da temperatura levou a uma maior ganho de atividade enzimática.

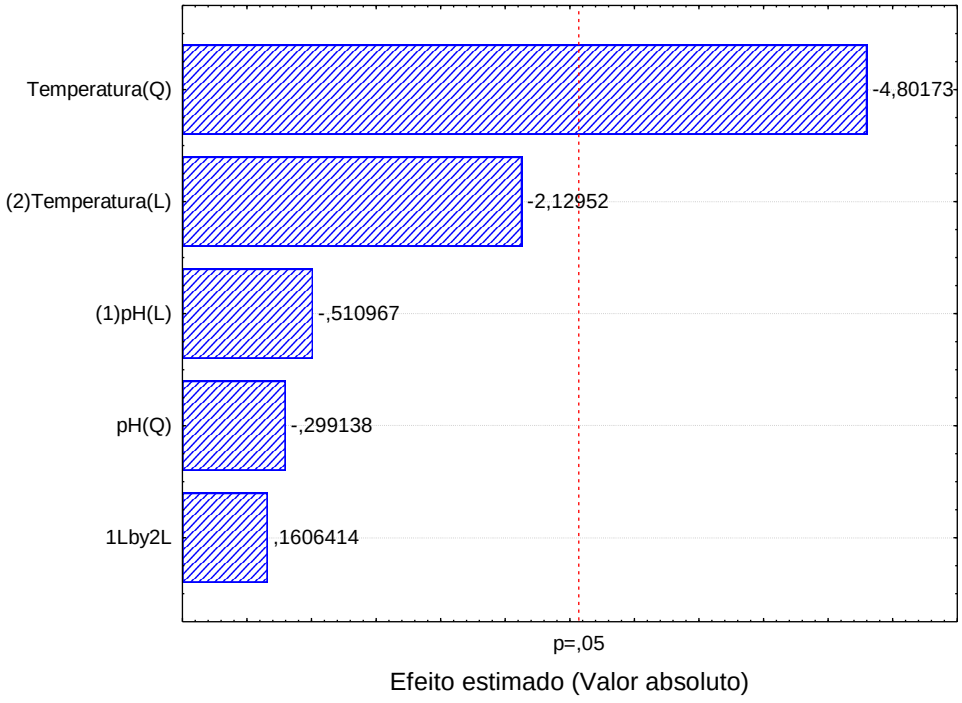


Figura 4.2– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em banho ultrassônico, p<0,05, 132 W.

Através da análise estatística, conclui-se que o uso do ultrassom alterou o comportamento da enzima. O pH foi significativo apenas com a ausência de ultrassom. O termo linear para a temperatura apresentou um valor positivo e um efeito mais pronunciado sobre a atividade na ausência de ultrassom, enquanto que na presença de ultrassom apenas o termo quadrático para a temperatura foi significativo, apresentando efeito negativo. Na Figura 4.3 pode ser visualizada a curva de contorno, onde pode ser visto claramente que a atividade máxima da xilanase foi obtida entre os pHs de 5,2 e 7 e entre as temperaturas de 43 a 47 ºC.

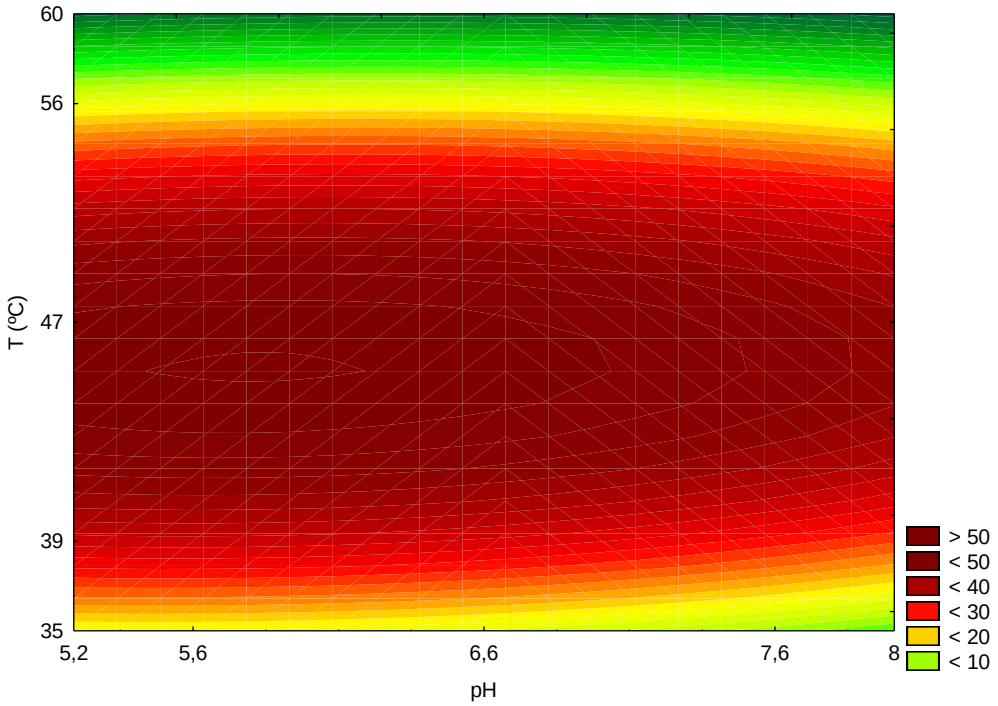


Figura 4.3 – Curva de contorno mostrando os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da xilanase na presença de ultrassom.

Estas diferenças nos resultados obtidos na presença e ausência de ultrassom são discutidas por alguns autores, no entanto não há nenhum esclarecimento acerca do assunto. No que concerne ao pH, alguns autores citam que o ultrassom quebra interações fracas e induz a mudanças conformacionais nas estruturas das proteínas (OZBEK; ULGEN, 2000; BATISTELLA et al., 2012; WANG et al., 2011; BASHARI et al., 2012), as quais podem ter causado a diferença na magnitude dos efeitos sobre a atividade entre os experimentos. Com relação à temperatura, sabe-se que a sonicação de um líquido causa dois efeitos primários, chamados de cavitação e aquecimento (WANG et al., 2011). Embora o efeito de aquecimento do ultrassom seja minimizado pelo controle da temperatura durante os experimentos, a tensão de cisalhamento causada pelo colapso das bolhas pode promover um leve aquecimento, que não é medido devido à posição do sensor, que pode resultar em um aumento local da temperatura, levando a um efeito menos pronunciado da temperatura na atividade enzimática na presença de ultrassom.

Bashari et al. (2012) avaliou o efeito da irradiação ultrassônica nas estruturas secundárias e terciárias de dextranases pela medição da fluorescência intrínseca e

espectro de dicroísmo circular na presença e ausência de irradiação ultrassônica. Eles observaram que a baixa intensidade ultrassônica induziu o desdobramento molecular da proteína, destruindo as interações hidrofóbicas das proteínas, disponibilizando mais grupos e regiões nas moléculas e diminuindo a fluorescência da dextranase. Por outro lado, os resultados das análises do espectro de dicroísmo circular mostrou que a fração da α-hélice aumentou por meio do ultrassom. Os autores atribuíram esse aumento às transformações causadas pelo tratamento com ultrassom, o qual afetou beneficamente a atividade enzimática.

4.2 Influência do ultrassom e GLP pressurizado sobre a atividade de xilanase

Na Tabela 4.2 constam os resultados obtidos no delineamento composto central (DCC) referente à atividade residual relativa da xilanase obtida após tratamento com GLP pressurizado e GLP pressurizado combinado com ultrassom, 154 W. Os dados também estão expressos em ganho ou perda de atividade.

Tabela 4.2- Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima xilanase NS50030 com GLP pressurizado, GLP e ultrassom (154 W) e ganho ou perda de atividade.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Tempo (h)	Atividade residual Relativa (%)		Ganho ou perda de atividade (%)	
				GLP	GLP e ultrassom	GLP	GLP e ultrassom
1	50 (-1)	30 (-1)	1 (-1)	242,4	83,8	142,4	-16,2
2	80 (+1)	30 (-1)	1 (-1)	108,6	13,8	8,6	-86,2
3	50 (-1)	270 (+1)	1 (-1)	120,9	75,9	20,9	-24,1
4	80 (+1)	270 (+1)	1 (-1)	9,5	14,2	-90,5	-85,8
5	50 (-1)	30 (-1)	6 (+1)	106,1	50,9	6,1	-49,1
6	80 (+1)	30 (-1)	6(+1)	14,3	19,6	-85,7	-80,4

Tabela 4.2 – Continuação.

7	50 (-1)	270(+1)	6 (+1)	100,5	62,3	0,5	-37,7
8	80 (+1)	270 (+1)	6 (+1)	10,3	14,9	-89,7	-85,1
9	65 (0)	150 (0)	3,5 (0)	22,0	16,1	-98,0	-83,9
10	65 (0)	150 (0)	3,5 (0)	19,0	18,2	-91,0	-81,8
11	65 (0)	150 (0)	3,5 (0)	17,2	18,4	-82,8	-81,6

De acordo com a tabela acima, os resultados da atividade residual relativa para o tratamento com GLP, houve uma grande variação entre os resultados obtidos, com ganhos e perdas de atividade. A atividade mais pronunciada foi verificada no experimento 1, condição na qual foi estudada o nível mais baixo de todas as variáveis do DCC, enquanto que perdas na atividade foram verificadas para as condições experimentais 4, 6 e 8 a 11.

Tendência similar foi verificada entre os experimentos 1 e 2, onde houve apenas o aumento da temperatura de 50 para 80 ºC, observou-se que a atividade residual relativa diminuiu consideravelmente. Comportamento similar foi verificado nos experimentos 3 e 4, onde também a variável que sofreu alteração foi a temperatura (de 50 para 80 ºC), sendo que a diminuição da atividade foi mais pronunciada no segundo caso. Para esses resultados é possível verificar a influência da pressão, de modo que um aumento na pressão de 30 para 270 bar, para os experimentos 1 e 2, ou 3 e 4, levou a diminuição da atividade residual relativa. O tempo de exposição também afetou negativamente a atividade da enzima, se verificado os experimentos 5 a 11, comparados aos experimentos 1 a 4. A análise dos efeitos das variáveis encontra-se na Figura 4.4.

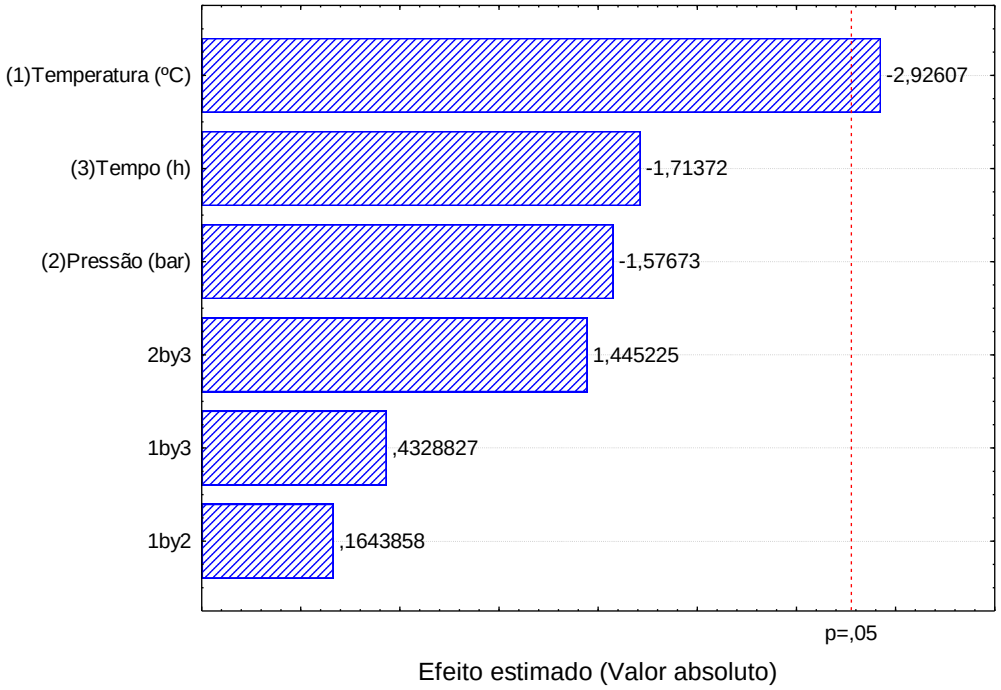


Figura 4.4– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em GLP pressurizado, p<0,05.

Somente a temperatura foi significativa estatisticamente (p<0,05) no intervalo estudado. Isso foi devido ao fato de o intervalo estudado ser muito amplo. Os resultados corroboram com Um e Walsun (2010), que afirmam que a temperatura ótima para a preparação enzimática está entre 35-55 ºC e acima desse limite a estabilidade da enzima diminui consideravelmente, justificando a diminuição pronunciada na atividade enzimática para temperaturas maiores que 50 ºC. Embora as outras variáveis não tenham sido significativas no intervalo avaliado, possivelmente influenciadas pelo forte efeito da temperatura, seus valores negativos são um indicativo que pressão maior que 30 bar e tempo de exposição maior que 1 hora é prejudicial para a atividade da xilanase.

Considerando o tratamento da xilanase com GLP pressurizado e ultrassom (6ª coluna da Tabela 4.2), foi verificada uma atividade residual relativa baixa em todas as condições experimentais (perda de atividade), indicando que o tratamento com ultrassom não foi eficaz para melhorar a atividade da xilanase. Esse resultado não corrobora com os resultados verificados na seção anterior, onde houve um ganho de atividade com a utilização do ultrassom. No entanto, as alterações promovidas na

enzima devido ao ultrassom, como, por exemplo, o desdobramento molecular da proteína, destrói interações hidrofóbicas das moléculas de proteína, causando mais grupos e regiões dentro das moléculas para expor para a parte externa (BASHARI et al., 2012) e nesse caso, o GLP pode ter desativado a estrutura terciária do seu sítio ativo.

Os dados da Tabela 4.2 foram utilizados na avaliação dos efeitos sobre a atividade da xilanase, de acordo com o Gráfico de Pareto da Figura 4.5. Somente a temperatura foi a variável significativa (p<0,05) no intervalo estudado, enquanto a pressão e o tempo de exposição apresentaram efeito negativo sobre a atividade residual relativa.

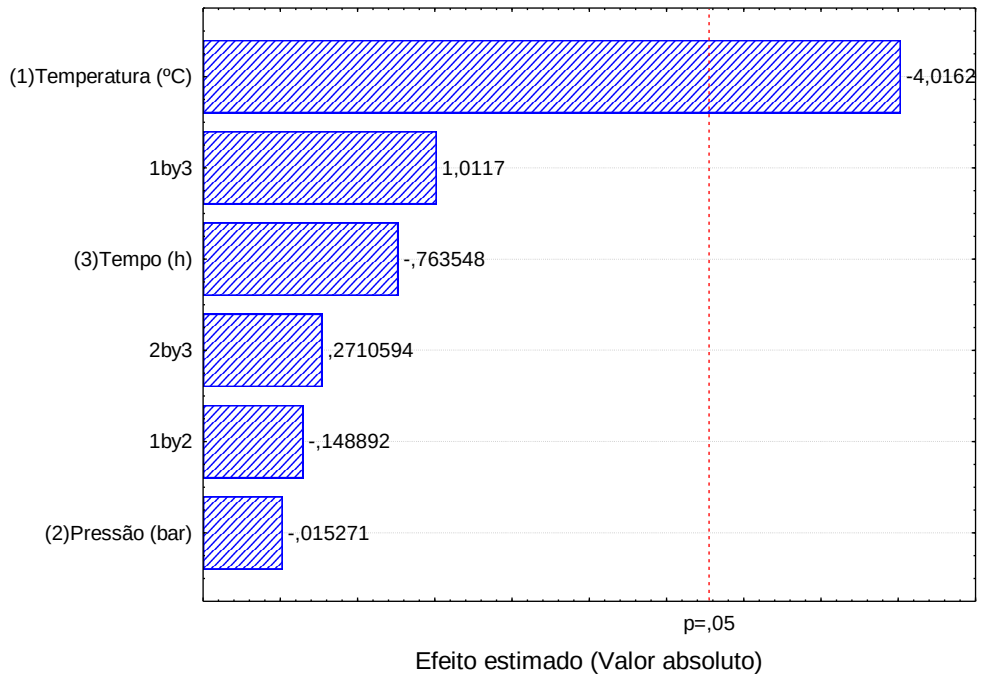


Figura 4.5– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da xilanase NS50030 em GLP pressurizado e ultrassom, p<0,05, 154 W.

Analisando os tratamentos a que a enzima foi submetida, a magnitude do efeito da temperatura foi maior para a enzima tratada com GLP pressurizado e ultrassom do que para a enzima tratada somente com GLP pressurizado. Esse resultado é corroborado com Bashari et al. (2012), que afirma que o ultrassom promove alteração na estrutura terciária de seu sítio ativo que, na presença de GLP pressurizado, levou

a resultados indesejáveis. Ainda, Wang et al. (2011) diz que a sonicação de um líquido causa dois efeitos primários, chamados de cavitação e aquecimento. No entanto, o efeito de aquecimento do ultrassom foi eliminado pelo controle da temperatura, e a tensão de cisalhamento causada pelo colapso das bolhas pode promover um leve aquecimento que não é medido devido à posição do sensor, que pode resultar em um efeito mais pronunciado da temperatura sobre a atividade enzimática.

4.3 Efeito do tratamento a alta pressão e ultrassom na atividade da celulase NS50013

A Tabela 4.3 apresenta os resultados da execução do planejamento experimental realizado para a enzima celulase a alta pressão utilizando como fluido pressurizado o GLP (gás liquefeito de petróleo) e também GLP pressurizado combinado com ultrassom.

Tabela 4.3– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado, GLP pressurizado e ultrassom (123 W), e ganho ou perda de atividade em ambos os casos.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Tempo (h)	Atividade residual Relativa (%)		Ganho ou perda de atividade (%)	
				GLP	GLP e ultrassom	GLP	GLP e ultrassom
1	40 (-1)	30 (-1)	1 (-1)	219,8	230,8	119,8	130,8
2	54 (+1)	30 (-1)	1 (-1)	64,5	34,8	-35,5	-65,2
3	40 (-1)	270 (+1)	1 (-1)	114,9	312,6	14,9	212,6
4	54 (+1)	270 (+1)	1 (-1)	167,7	381,1	67,7	281,1
5	40 (-1)	30 (-1)	6 (+1)	122,9	171,8	22,9	71,8
6	54 (+1)	30 (-1)	6(+1)	3,90	68,6	-96,1	-31,4
7	40 (-1)	270(+1)	6 (+1)	168,9	15,7	68,9	-84,3
8	54 (+1)	270 (+1)	6 (+1)	44,5	33,9	-55,5	-66,1

Tabela 4.3 – Continuação.

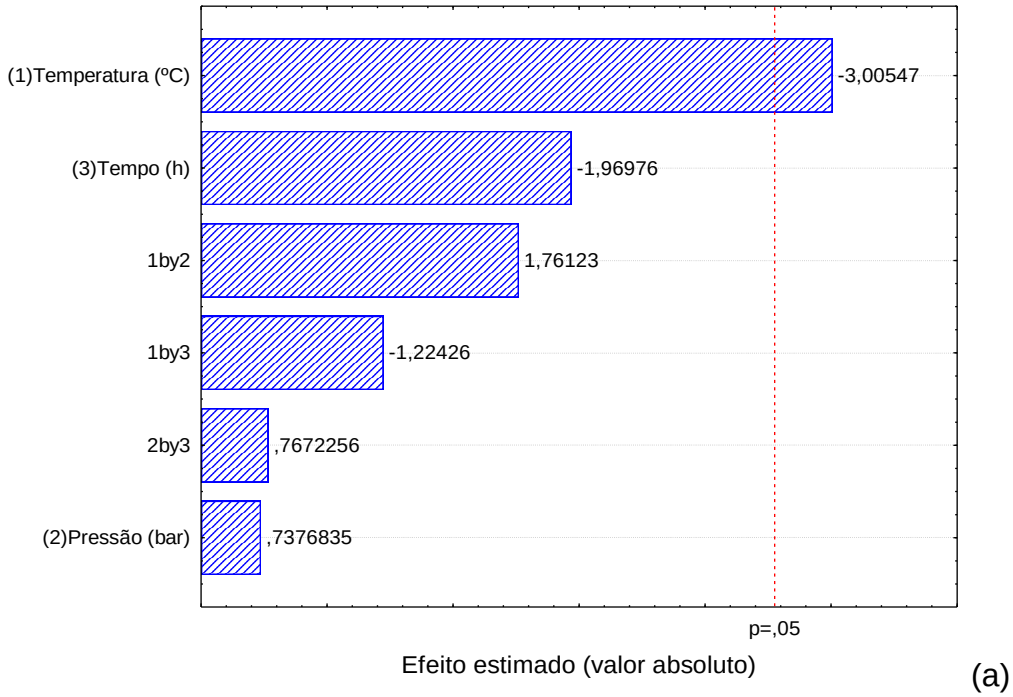
9	47 (0)	150 (0)	3,5 (0)	115,6	178,0	15,6	78,0
10	47 (0)	150 (0)	3,5 (0)	117,9	162,2	17,9	62,2
11	47 (0)	150 (0)	3,5 (0)	120,6	179,3	20,6	79,3

De acordo com os resultados obtidos, o maior ganho em atividade residual relativa, considerando os ensaios com GLP pressurizado, foi obtido no experimento 1 (T=40°C, P=30 bar, t=1 h), com 219,8%. Também verifica-se que os resultados obtidos no ponto central do DCC demonstraram a boa reprodutibilidade dos dados experimentais, pois foram verificados desvios baixos entre a triplicata. Observou-se que a atividade enzimática da celulase era muito instável; dessa forma optou-se em medi-la todos os dias em que eram realizados os experimentos. Após o término dos mesmos, a atividade continuou sendo medida periodicamente.

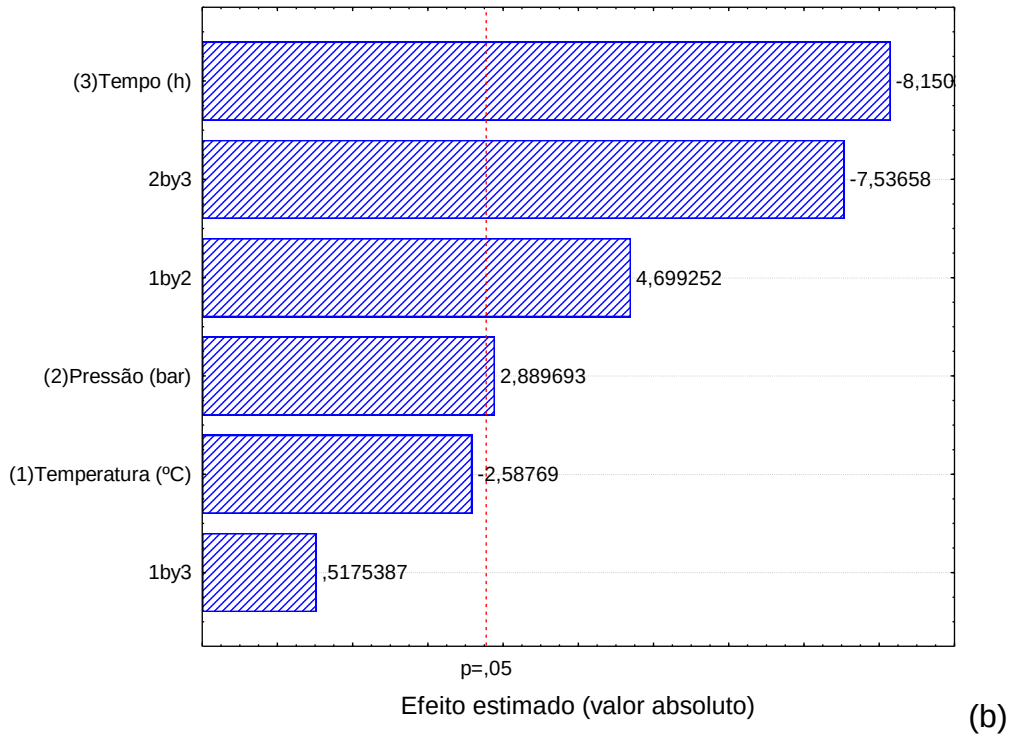
Pode-se verificar também que os experimentos que resultaram em uma menor atividade tinham em comum a temperatura (54 °C), seguidos do tempo de exposição ao fluido de 6 horas. Dessa forma pode-se inferir que apesar de apenas a temperatura ter sido estatisticamente significativa neste estudo (Figura 4.6a), o tempo de exposição ao fluido também é importante nesse processo, pois os ensaios onde foram obtidas as menores atividades residuais relativas tinham os maiores tempos de exposição ao GLP pressurizado, juntamente com a temperatura mais elevada. De acordo com Paljevac et al. (2007), uma vez que as enzimas são proteínas, sua atividade é fortemente dependente da temperatura. Em altas temperaturas, as interações fracas que dão sustentação à estrutura globular da proteína são destruídas, seguidas de inativação. Além disso, as características apolares do GLP, combinadas com a alta temperatura, podem favorecer a solubilidade de resíduos apolares de proteína, levando à inativação.

Com relação aos experimentos envolvendo GLP e ultrassom, houve um aumento na atividade residual relativa na maioria dos ensaios, sendo que a maior atividade residual foi com a condição 4, com 381%, experimento este consistia da maior temperatura e maior pressão estudadas, seguidos dos ensaios 3, 1, ponto central e experimento 5. Nesse tratamento observa-se através do gráfico de Pareto (Figura 4.6b) que o parâmetro que mais influenciou na atividade da enzima foi o tempo de

exposição, influenciando negativamente na atividade residual. As interações entre pressão e tempo e entre temperatura e pressão também foram significativas a 95% de confiança.



(a)



(b)

Figura 4.6– Gráfico de Pareto para o tratamento da celulase NS50013 em: (a) GLP pressurizado, p<0,05; (b) GLP pressurizado e ultrassom, p<0,05, 123 W.

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para a validação do modelo matemático codificado utilizado para a predição da atividade enzimática da celulase em GLP pressurizado. O valor de F reflete a razão entre a soma quadrática média devido à regressão e a soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo**.** Analisando a Tabela 4.4, o F calculado é 3 vezes maior que o F tabelado. Isso valida o modelo a seguir, com 95% de confiança.

$$A = 116{,}9 - 43{,}2.T + 10{,}6.P - 28{,}3.t + 25{,}3.T.P - 17{,}6.T.t + 11.P.t \quad (5)$$

Tabela 4.4– ANOVA (análise de variância) para o tratamento da celulase com GLP pressurizado.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	30888,8	6	30888,8	18,65
Resíduo	6623,0	4	1655,7	
Total	37511,8	10		

$R = 0{,}91$; $F_{(0,95;6;4)} = 6{,}16$

A partir da análise dos efeitos apresentados na Fig. 4.6 pode-se sugerir que os tratamentos utilizados neste trabalho podem modificar o comportamento da enzima, o que pode ser explicado com base na solubilidade do GLP em enzima líquida, que é muito baixa, devido à natureza hidrofóbica desse gás. No tratamento de uma solução enzimática com o GLP pressurizado, um contato muito baixo entre a enzima e o GLP pode ser esperado, devido à baixa solubilidade mútua e o fato de que o sistema não foi mantido sob agitação durante os experimentos**.** Nesse sentido, numa mesma condição de temperatura e pressão, levando em consideração que não há mistura de GLP com solução enzimática, ocorre uma diminuição no tempo de meia vida da enzima, de maneira que o aumento da temperatura tenha um efeito negativo na atividade da enzima.

Entre os estudos reportados na literatura, observa-se que os resultados dos tratamentos utilizando fluidos pressurizados são dependentes da enzima em questão, a começar por Knez e Habulin (2002). Os autores se referem que as diferenças na partição da água são responsáveis pela maior atividade de lipase em propano comparada a CO_2. Além disso, a baixa constante dielétrica do propano favorece a abertura do sítio ativo da enzima. O efeito hidrofóbico e o desenvolvimento de ligações de hidrogênio intramolecular são as principais forças de estabilização de proteínas. Na presença de alguns solventes orgânicos, proteínas devem expor seus resíduos apolares, ocorrendo o desdobramento da proteína. Espera-se que os fluidos pressurizados com baixa constante dielétrica, como o propano, possam contribuir para este fenômeno. Dessa forma, pode-se sugerir que o propano possa manter ou aumentar a atividade enzimática (ANDRADE et al., 2008).

Oliveira et al. (2006) avaliaram os efeitos da pressão, temperatura e tempo de contato com a lipase Novozym 435 utilizando como fluidos pressurizados CO_2, propano e n-butano. O estudo revelou que o tratamento com dióxido de carbono levou a perdas na atividade, enquanto o uso de propano e n-butano promoveu melhorias da atividade da enzima. Em geral, dentro da faixa estudada, a temperatura e tempos de exposição afetaram positivamente a atividade enzimática. Os autores ainda citam que o aumento da atividade enzimática pode estar associado possivelmente com as características hidrofóbicas do propano e n-butano, e devido à afinidade da enzima com estes solventes.

Knez e Habulin (1998) avaliaram a estabilidade da lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, durante 46 horas, a 60 °C e pressão atmosférica, após exposição a n-butano e a uma mistura de propano:n-butano (70:30), a 100 bar e 35 °C. Nessas condições quase não houve perda de atividade.

Com a enzima proteinase de mamão (*Carica papaya*), Habulin, Primozic e Knez (2005) observaram a diminuição da atividade a 300 bar e 24 h utilizando propano como fluido pressurizado, comparada a CO_2 supercrítico. Nesse caso, a enzima pode ter uma maior afinidade com solventes que podem formar ligações de hidrogênio.

Andrade et al. (2008) estudaram o efeito do tratamento de D-hidantoinase liofilizada a partir de feijão Azuki (*V. angularis*) em propano comprimido. Em termos de atividade residual, a enzima mostrou boa estabilidade nesse solvente, não havendo muita perda nem ganho de atividade nas condições estudadas, variando pressão,

temperatura e tempo de exposição. Em condições de pH de 10 e 11 foram observados aumentos de 33% na atividade residual dessa enzima em tratamento com propano.

Em tratamento com GLP, a enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 apresentou um aumento de 163% na atividade residual utilizando GLP. Com a inulinase de *Aspergillus niger*, foi observado um aumento de 129% na atividade residual relativa. Os autores concluiram que a atividade da enzima após o tratamento com GLP pressurizado depende da natureza estrutural da enzima e das condições experimentais aplicadas, tais como o tempo de exposição, a taxa de despressurização e a pressão do sistema (SILVA et al., 2013a).

Silva et al. (2013b) obtiveram melhores resultados no rendimento da produção de frutooligossacarideos de origem microbiana, quando as enzimas inulinases foram previamente tratadas com GLP, em comparação com outros fluidos, como CO_2, propano e n-butano pressurizados. Pelos resultados obtidos, o uso de fluidos pressurizados, como GLP, é importante no sentido de melhorar o desempenho da enzima, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos processos.

Uma comparação entre os valores de atividade residual relativa obtidos com GLP pressurizado e GLP pressurizado juntamente com ultrassom pode ser visualizada na Figura 4.7.

Em geral, houve um comportamento semelhante com relação ao ganho ou perda de atividade residual, comparado ao tratamento somente com GLP pressurizado. Na grande maioria das condições em que houve um ganho em atividade residual nos experimentos com GLP pressurizado, com a adição de ultrassom houve um ganho ainda maior.

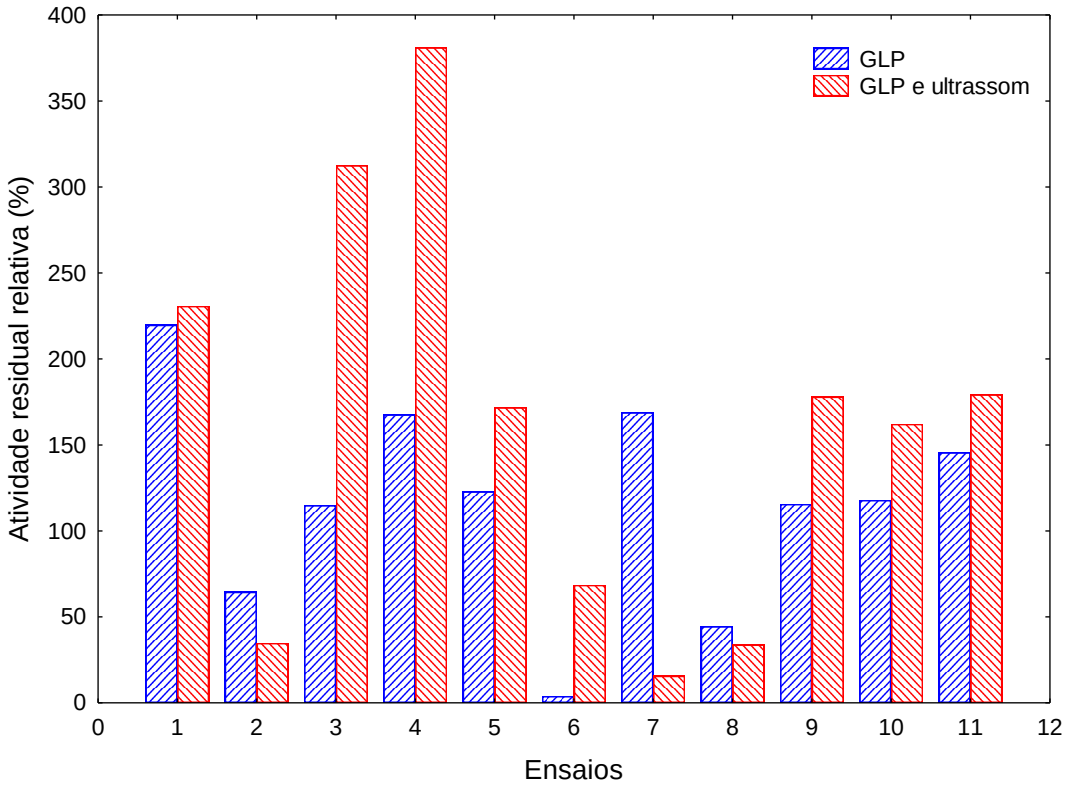


Figura 4.7– Comparação entre os dados de atividade residual relativa da enzima celulase NS50013 obtidos somente com GLP pressurizado e com a junção de ultrassom.

O tratamento simultâneo com GLP pressurizado e ultrassom está vinculado a um melhor contato entre a enzima e o GLP devido à cavitação provocada pelo ultrassom, certamente melhorando a transferência de massa em toda a mistura. Neste caso, os efeitos de interação da temperatura, pressão e tempo de exposição foram significativos, indicando que o contato da enzima e GLP leva a alterações na conformação da proteína. Como o ganho de atividade foi superior para a técnica combinada, pode salientar-se que GLP interage com a estrutura terciária da enzima aumentando a sua atividade.

Deste ponto de vista, é possível afirmar que o GLP aumenta o poder catalítico da enzima, tornando-se, portanto, um solvente interessante para tratar a enzima antes da sua utilização no processo, ou para realizar reações, usando GLP como meio de reação enzimática. Esta afirmação é suportada pelos resultados mostrados na Fig. 4.7, que compara o ganho / perda de atividade enzimática obtida a partir de ambas as

técnicas de tratamento. Com poucas exceções, o ganho de atividade enzimática foi maior para o tratamento combinado envolvendo GLP pressurizado e ultrassom do que para GLP pressurizado apenas. No experimento 4, este aumento foi de cerca de três vezes maior.

Com relação à influência da temperatura sobre a atividade enzimática, Liu et al. (2008) observaram que a temperatura ótima e de inativação da lipase em banho ultrassônico foi entre 5-10°C maior, comparado com a ausência de ultrassom. Já Rokhina, Lens e Virkutyte (2009) afirmam que a tolerância de enzimas após tratamento com ultrassom pode depender da localização fisiológica da enzima na célula e do seu peso molecular, e também que o processo de sonicação não destrói o sítio ativo da enzima, ao contrário da desnaturação pelo calor.

Condon et al. (2009) observaram o aumento da taxa de hidrólise da Accelerase 1000, tendo como substrato resíduos de uma indústria têxtil. Os autores se referem que o ultrassom causa uma agitação mecânica, e dessa forma pode aumentar a transferência de calor e massa na superfície do substrato, ao romper as camadas interfaciais, ativando o desempenho catalítico das macromoléculas da enzima adsorvida na superfície do substrato. Do mesmo grupo de trabalho, Yachmenev et al. (2009) também obtiveram resultados positivos com a utilização de ultrassom na hidrólise de palha de milho e bagaço de cana, utilizando a enzima celulase de *Trichoderma reseei* ATCC 26921.

Yasuda et al.(2010) consideraram que o ultrassom rompe fisicamente a superfície da celulose, acelera a difusão da celulase e remove a celulase que esteja inativada juntamente com a glicose. Barton et al. (1996) cita que o ultrassom tem o potencial de influenciar a taxa de reação em várias maneiras, sendo que é um processo que deixa a mistura de reação mais homogênea, facilitando a difusão para os sítios ativos da enzima.

Wang et al. (2011) diz que o ultrassom aumenta a atividade enzimática, pois a irradiação de baixa frequência pode causar efeitos estáveis de cavitação, o que altera a configuração da enzima e melhora sua atividade. Tendo um efeito de cavitação estável e transferência de massa, uma mistura mais homogênea é alcançada. Isso favorece o movimento dos reagentes ao sítio ativo da enzima, aumentando a eficiência da reação. Ainda, o autor cita a formação de radicais contendo O_2 que são formados no campo de cavitação do ultrassom. Quimicamente, os radicais hidroxila

produzidos pelo ultrassom podem reagir com as moléculas intermediárias produzidas pela enzima, limitando sua inativação.

Dessa forma, pode-se dizer que o aumento da atividade da celulase em GLP pressurizado e ultrassom está relacionado à afinidade da enzima com o solvente, e que o tratamento com ultrassom contribuiu para uma melhora na transferência de massa entre a enzima e o solvente, facilitando o processo de difusão, contribuindo para o aumento da atividade em determinadas condições experimentais.

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para a validação do modelo matemático codificado utilizado para a predição da atividade enzimática da celulase em GLP pressurizado e ultrassom. Analisando a Tabela 4.5, o F calculado é 26 vezes maior que o F tabelado, com o coeficiente de determinação de 0,98. Isso valida o modelo a seguir, com 95% de confiança.

Tabela 4.5– ANOVA (análise de variância) para o tratamento da celulase com GLP pressurizado, combinado com ultrassom.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	135380,3	6	135380,3	160,64
Resíduo	3371,0	4	842,7	
Total	138751,2	10		

$R = 0,98$; $F_{(0,95;6;4)} = 6,16$

$$A = 160,8 - 26,6.T + 29,7.p - 83,6.t + 48,2.T.p + 5,3.T.t - 77,4.p.t \quad (6)$$

Onde *A* é a atividade residual relativa, *T, p* e *t* são os valores codificados para temperatura, pressão e tempo, respectivamente.

Na Figura 4.8, com a superfície de reposta e curva de contorno, pode ser visualizado os intervalos nos quais houve maior registro de atividade residual relativa

da celulase. Correlacionando as variáveis pressão e tempo, as figuras indicam que as maiores atividades residuais relativas foram alcançadas nas reações onde foram testadas maiores pressões nos menores tempos.

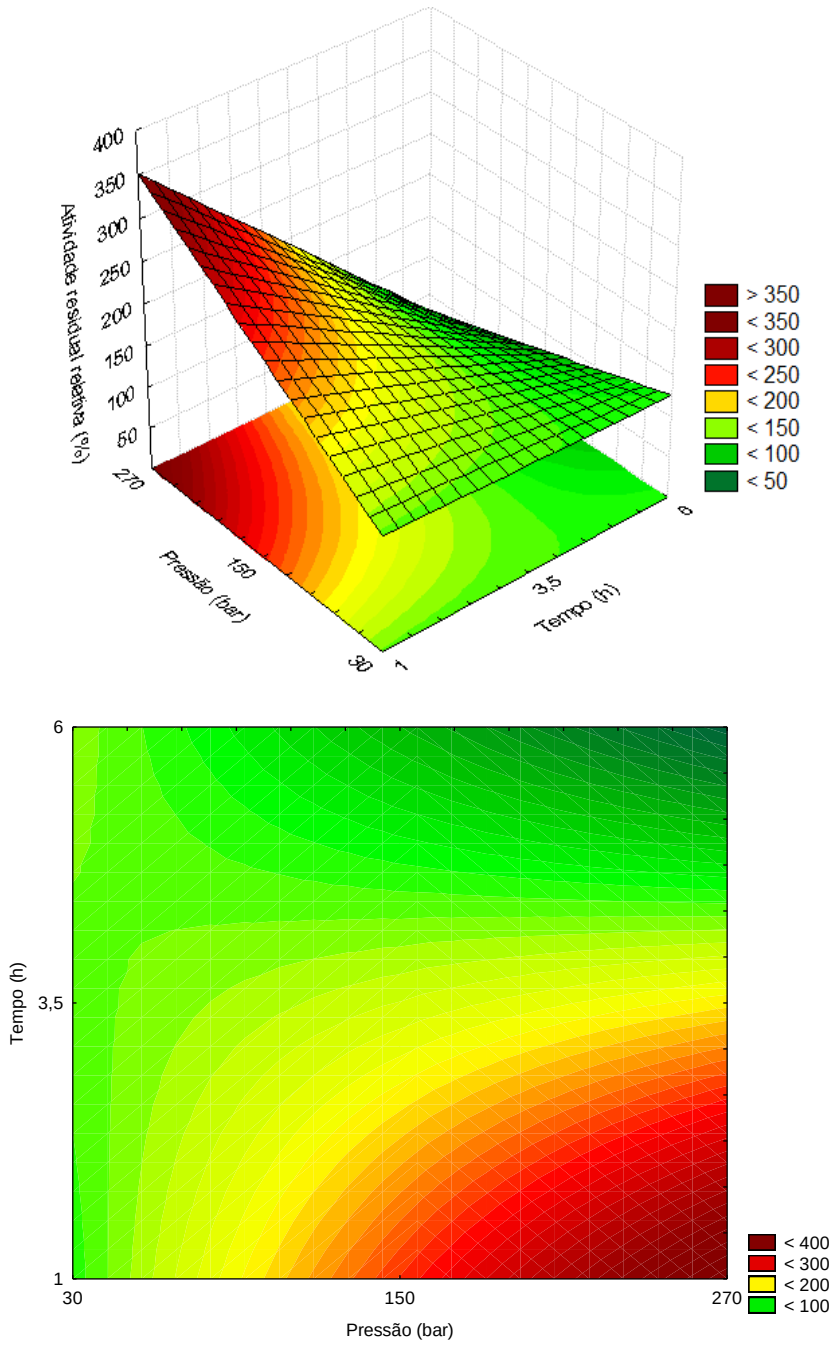


Figura 4.8- Superfície de resposta e curva de contorno, correlacionando o tempo e a pressão utilizados nos experimentos envolvendo a celulase NS50013.

4.4 Efeito do tratamento da enzima celulase com fluido pressurizado variando a potência do ultrassom

Como foi observado que os menores tempos de exposição ao fluido tiveram maior influência sobre a atividade da celulase, um novo planejamento foi conduzido, a fim de estudar o efeito da variação da potência do ultrassom e o tempo sobre a atividade da enzima celulase. A temperatura e pressão foram fixadas no ponto central (47,5°C e 150 bar). O intervalo de variação do tempo foi de 10 a 60 minutos. Já a potência do ultrassom variou de 31 W a 154 W. Dessa forma, foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^2. A Tabela 4.6 apresenta os resultados para o planejamento estudado.

Tabela 4.6– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de atividade residual relativa para o tratamento da enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado, variando a potência do ultrassom e tempo.

Experimento	Potência do Ultrassom (W)	Tempo de exposição (min)	Atividade Residual Relativa (%)
1	31 (-1)	10 (-1)	185,9
2	154 (+1)	10 (-1)	80,9
3	31 (-1)	60 (+1)	297,4
4	154 (+1)	60 (+1)	383,8
5	92 (0)	35 (0)	175,2
6	92 (0)	35 (0)	153,8
7	92 (0)	35 (0)	171,8

Como pode ser observado na tabela acima, os ensaios 3 e 4 obtiveram uma maior atividade residual relativa, nesses ensaios foram avaliados os extremos de potência do ultrassom e tempo de exposição ao tratamento. De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 4.9), apenas o tempo foi significativo estatisticamente, a

95% de confiança, indicando que os maiores tempos levam a maiores atividades residuais relativas.

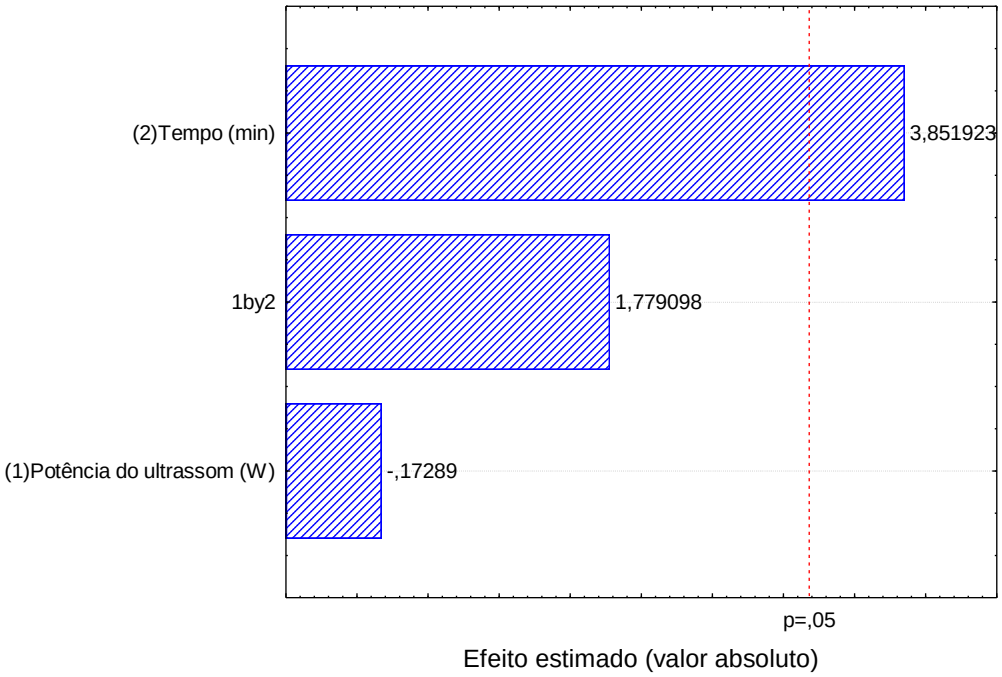


Figura 4.9 – Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas no tratamento da celulase NS50013 em GLP pressurizado, combinado com ultrassom, variando sua potência e tempo, p<0,05.

Em dados obtidos na literatura acerca da variação da intensidade ultrassônica, Li et al. (2004) observaram um aumento da sacarificação de polpa de papel com celulase em tanque agitado. Foram estudadas potências de até 45 W, sendo com esta potência a maior taxa de sacarificação. Xiao et al. (2005), utilizando ultrassom com frequência de 20 kHz, observaram que o aumento da potência diminuiu o tempo de reação de transesterificação de glicose envolvendo solventes e protease de *B. subtilis*.

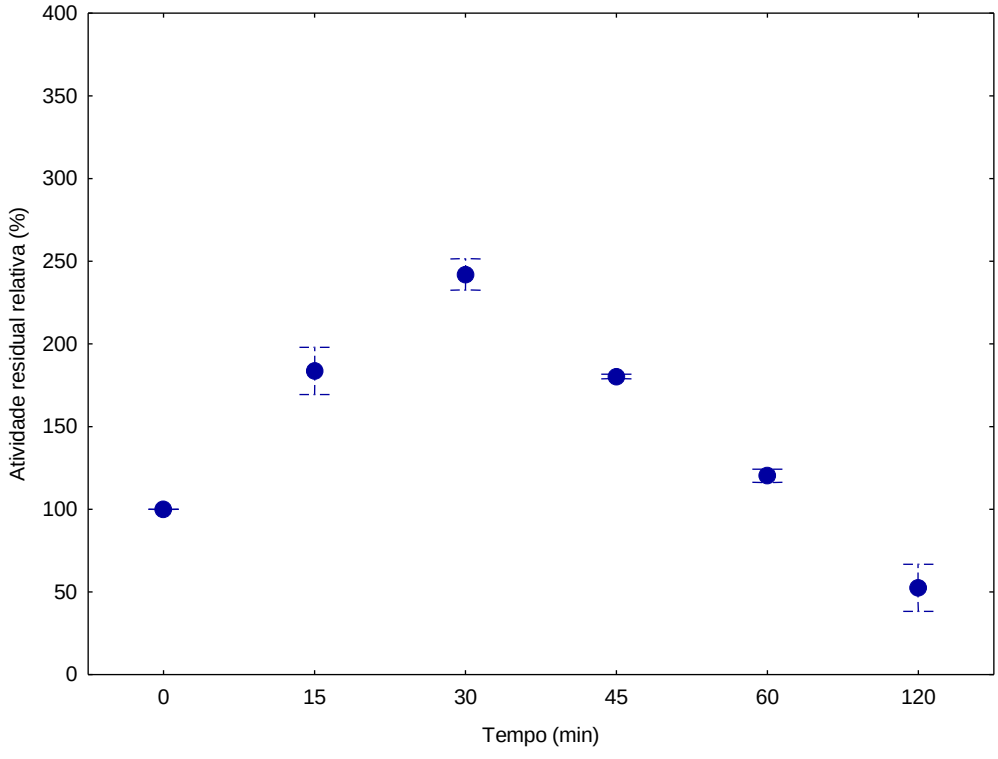
A potência é um fator importante em reações conduzidas sob ultrassom. As ondas ultrassônicas de baixa intensidade têm um efeito menor sobre a transferência de massa de uma solução, em comparação à alta intensidade, a qual aumenta a transferência de massa. Por outro lado, o aumento da intensidade do ultrassom pode levar à inativação da enzima (ÖSBEK; ÜLGEN, 2000; ERCAN; SOYSAL, 2011). Portanto, o aumento da energia ultrassônica, em um intervalo apropriado, pode

aumentar a atividade enzimática, devido à diminuição da inibição pelo substrato e uma menor aglomeração da enzima (LIU et al., 2008).

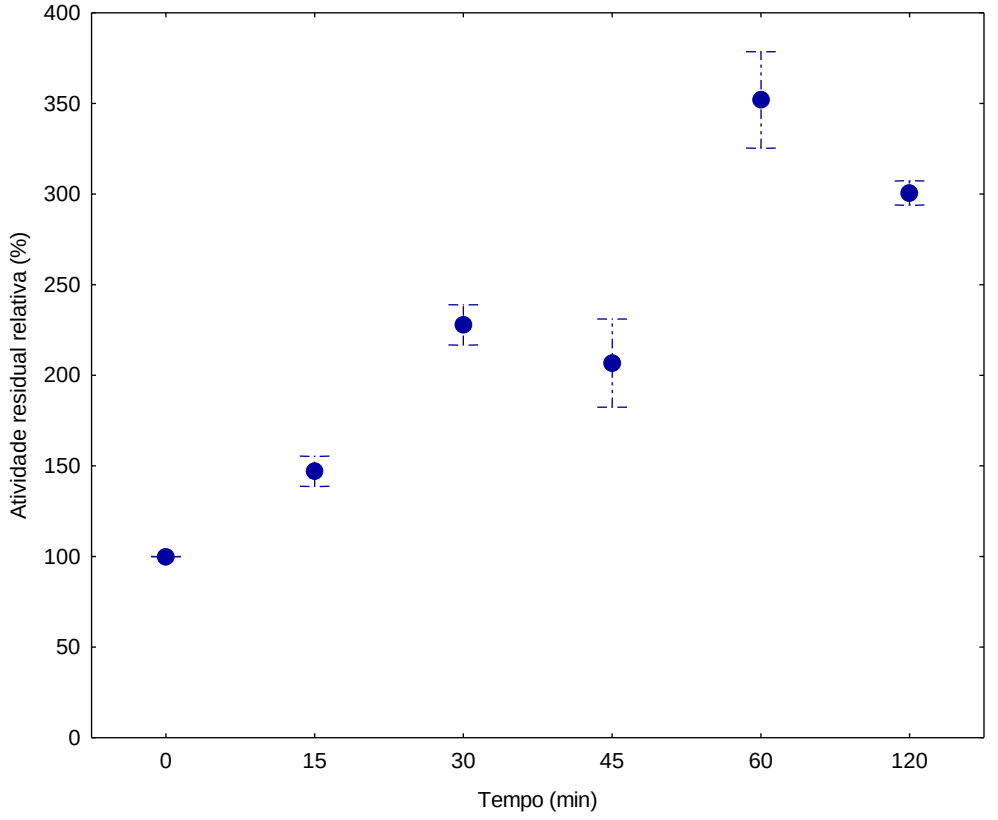
4.5 Influência do tempo de tratamento com GLP pressurizado e ultrassom na atividade da celulase

Conforme os resultados dos ensaios da Tabela 4.6, foi realizada uma cinética, visando determinar o tempo ótimo para a atividade residual relativa, levando em consideração as potências de 31 W e 154 W. Para tanto, foram conduzidos experimentos nos tempos de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, com pressão de 150 bar e temperatura de 47,5 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata. Com a potência do ultrassom de 31 W foi alcançada uma atividade residual relativa de 241% no tempo de 30 minutos, e com a potência de 154 W foi obtida uma atividade residual relativa de 350%, com tempo de 60 minutos, conforme a Figura 4.10. Portanto, o maior ganho em atividade residual relativa no processo foi utilizando a potência de 154 W.

Usualmente, um aumento na potência do ultrassom proporcionará um aumento nos efeitos sonoquímicos, devido a um aumento do processo de cavitação (FILGUEIRAS et al., 2000). Com isso poderá ser aumentada a transferência de massa, influenciando no sítio ativo da enzima e aumentando a atividade enzimática (WANG et al., 2011; CONDON et al., 2009). Estes fatos podem ser considerados relevantes nas cinéticas realizadas.



(a)



(b)

Figura 4.10– Cinética da atividade residual relativa da enzima celulase NS50013 (média e erro padrão), submetida a tratamento com GLP pressurizado, variando a potência do ultrassom: (a) 31 W; (b) 154 W.

4.6 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando GLP como fluido pressurizado

Após as análises realizadas com as enzimas xilanase e celulase e os tratamentos realizados com GLP pressurizado e GLP pressurizado simultaneamente com ultrassom, foi observado que o tratamento com fluido pressurizado não teve o efeito esperado para a xilanase, na qual foi conseguido um aumento considerável em apenas uma condição experimental, com os níveis mais baixos estudados pelo delineamento composto central, e sem a utilização de irradiação ultrassônica. Sabe-se que para hidrolisar o bagaço de cana com a utilização de fluidos pressurizados é necessária a utilização de pressões elevadas para obter o rompimento da cadeia de celulose, e assim, em conjunto com a enzima, hidrolisá-la em açúcares fermentáveis.

Dessa forma, para a próxima etapa do trabalho, a de hidrólise enzimática do bagaço de cana com GLP pressurizado, e em combinação com ultrassom, foi utilizado apenas a celulase NS50013, pelo desempenho considerável obtido anteriormente no estudo envolvendo a enzima com GLP pressurizado e ultrassom.

Nas análises de caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar peneirado, encontraram-se os seguintes valores: celulose 39,17%, hemicelulose 35,52% e lignina 1,12%. Considerando que foi utilizada nestes experimentos a enzima celulase NS50013, a composição do bagaço de cana que se torna hidrolisável com a utilização dessa enzima é a celulose. Sendo assim, para os cálculos de eficiência do processo será utilizada a porcentagem de celulose existente no bagaço de cana-de-açúcar.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados do delineamento composto central em termos de açúcares redutores totais obtidos na execução dos 11 ensaios. Foram obtidos valores de ART de 0,1672 a 0,2450 g/g bagaço. Os melhores resultados foram obtidos no experimento 8, seguidos do ponto central e experimento 6. Considerando a celulose total do bagaço de cana utilizado nesse trabalho de 0,3917 g/g, o melhor resultado corresponde a uma eficiência do processo, em termos de celulose, de 62,5%.

Tabela 4.7– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima NS50013 com GLP pressurizado.

Experimento	Umidade (%)	Pressão (bar)	Enzima (%)	ART (g/g de bagaço)
1	40 (-1)	50 (-1)	2 (-1)	0,1805
2	80 (+1)	50 (-1)	2 (-1)	0,1769
3	40 (-1)	200 (+1)	2 (-1)	0,1903
4	80 (+1)	200(+1)	2 (-1)	0,1916
5	40 (-1)	50 (-1)	10 (+1)	0,1672
6	80 (+1)	50 (-1)	10 (+1)	0,2071
7	40 (-1)	200 (+1)	10 (+1)	0,1980
8	80 (+1)	200 (+1)	10 (+1)	0,2450
9	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,1870
10	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,2174
11	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,2104

ART= glicose e xilose

Os dados da Tabela 4.7 foram utilizados para a avaliação dos efeitos das variáveis sobre a quantidade de açúcares liberados, que são apresentados na Figura 4.11. Como pode ser visto na figura, a pressão, umidade e interação entre umidade e enzima tiveram efeito significativo positivo sobre a hidrólise, ($p<0,1$). Isso indica que o aumento da umidade do bagaço de cana, o aumento da pressão e também o aumento da umidade e quantidade de enzima adicionada levaram a uma maior taxa de ART.

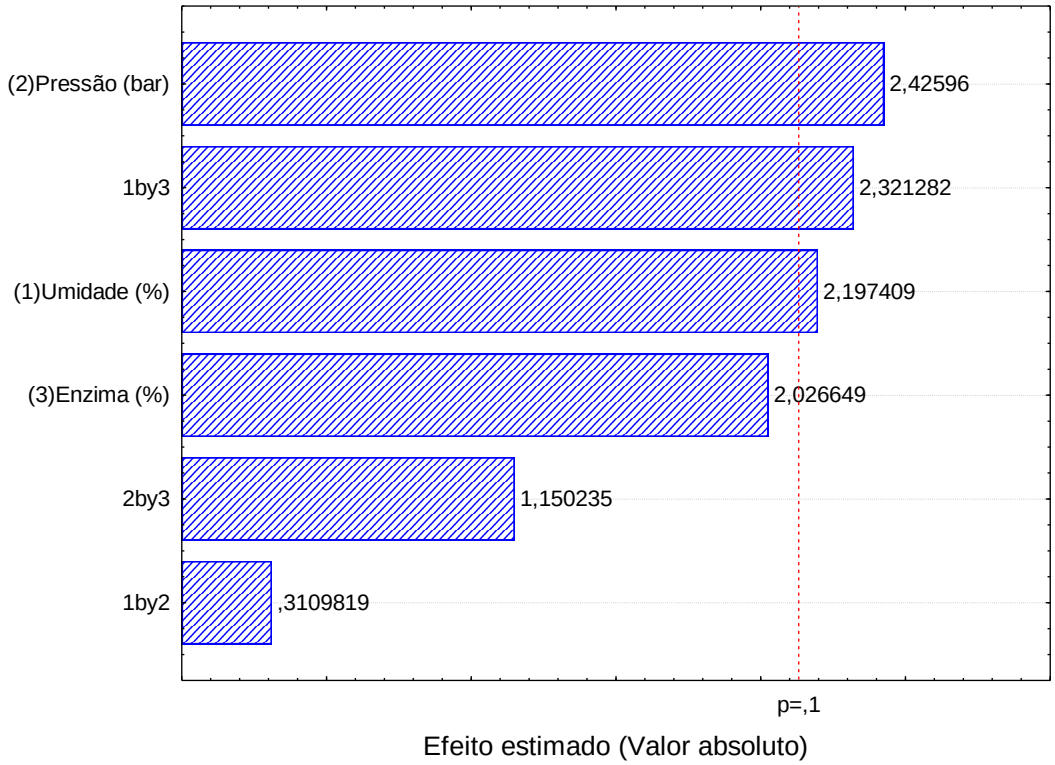


Figura 4.11– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana utilizando GLP pressurizado, p<0,1.

Três fatores devem ser considerados nesse processo: a matéria-prima (bagaço de cana-de-açúcar), o fluido pressurizado utilizado (GLP) e o complexo celulolítico NS50013. O bagaço de cana, apesar de ter sido peneirado, ainda continha quantidade de fibras, o que pode ter contribuído para a dificuldade em hidrolisar a parte celulósica. Em adição, o gás liquefeito de petróleo é um fluido de natureza hidrofóbica, e agiu em todos os ensaios com baixa solubilidade com o bagaço de cana que continha certa umidade.

Nesses experimentos buscou-se utilizar a menor quantidade possível de enzima, e verificar qual era seu efeito na hidrólise. Convém ressaltar a baixa atividade enzimática da celulase, que por ser uma enzima líquida, se tornava menos estável; sendo assim verificada periodicamente, atingindo valores no intervalo de 3-5 FPU/mL. Dessa forma, além da enzima ter atividade enzimática baixa, infere-se que haja no meio grande quantidade de celobiose, necessitando de uma enzima mais específica para degradá-la em glicose, como a β-glucosidase. Yang et al. (2012) utilizaram β-glucosidase em excesso para prevenir o acúmulo de celobiose. Já grande parte de

trabalhos reportados na literatura utiliza a junção de duas ou mais enzimas para conseguir bons resultados em hidrólises, citando alguns: Dagnino et al. (2013), Wanderley et al. (2013), García-Aparicio et al. (2011), Rabelo et al. (2011), Soares et al. (2011), Santos, Kawase e Coelho (2011). Dionísio et al. (2009) encontraram cerca de 20% a menos de conversão de celulose em glicose utilizando apenas a celulase NS50013, em comparação com outras condições estudadas, utilizando celulase e celobiase, e celulase, celobiase e xilanase.

4.7 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando GLP como fluido pressurizado combinado com ultrassom

A Tabela 4.8 apresenta os resultados da hidrólise enzimática de bagaço de cana, utilizando fluido pressurizado e também ultrassom (154 W).

Tabela 4.8– Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima celulase NS50013 com GLP pressurizado e ultrassom (154 W).

Experimento	Umidade (%)	Pressão (bar)	Enzima (%)	ART (g/g de bagaço)
1	40 (-1)	50 (-1)	2 (-1)	0,1751
2	80 (+1)	50 (-1)	2 (-1)	0,2017
3	40 (-1)	200 (+1)	2 (-1)	0,1935
4	80 (+1)	200(+1)	2 (-1)	0,2172
5	40 (-1)	50 (-1)	10 (+1)	0,1747
6	80 (+1)	50 (-1)	10 (+1)	0,1997
7	40 (-1)	200 (+1)	10 (+1)	0,2019
8	80 (+1)	200 (+1)	10 (+1)	0,2153
9	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,2095

Tabela 4.8 – Continuação.

10	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,2097
11	60 (0)	125 (0)	6 (0)	0,2043

ART= glicose e xilose

A Tabela 4.8 apresenta os resultados referentes à hidrólise do bagaço de cana com GLP e ultrassom. Observa-se que os melhores resultados estão no experimento 4, seguido do experimento 8 e ponto central. Entre os ensaios 4 e 8, a diferença se encontra na porcentagem de enzima utilizada, onde foram utilizados o mínimo e máximo de enzima testada. De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 4.12), as variáveis umidade e pressão foram significativas positivamente, $p<0,05$. Nesse caso, a eficiência do processo, calculada em termos de celulose, é de 55,4%.

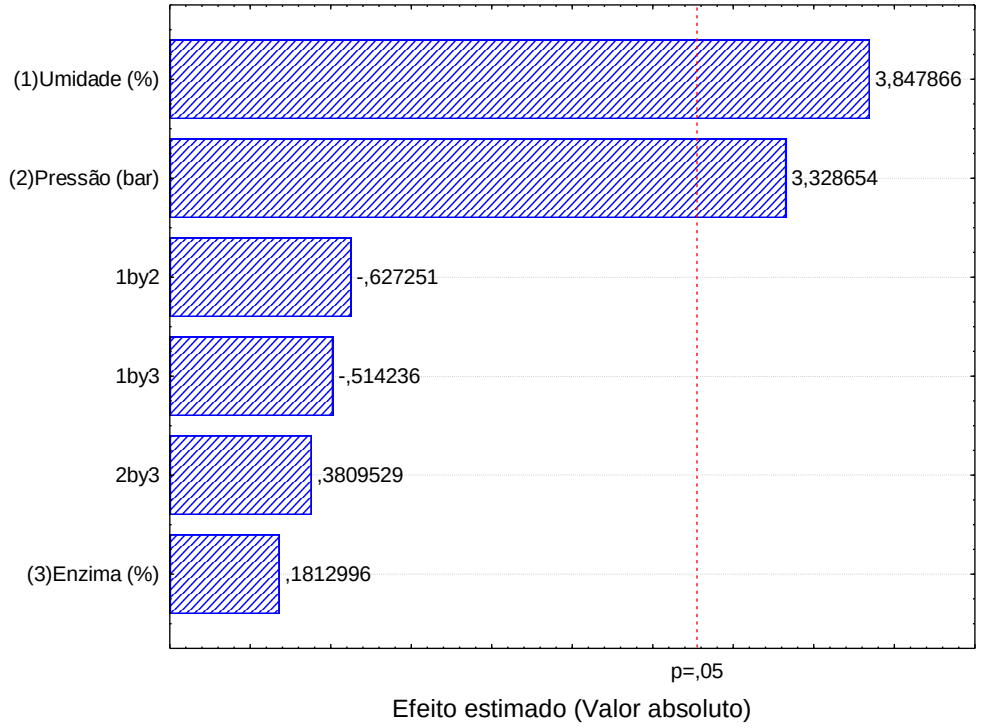


Figura 4.12– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana utilizando GLP pressurizado e ultrassom, $p<0,05$.

Fazendo um comparativo juntamente com os experimentos sem ultrassom, percebe-se que a maior quantidade de ART/g de bagaço foi encontrada no experimento no qual não foi utilizado o ultrassom. Entretanto, em metade dos ensaios, a quantidade de açúcares redutores totais aumentou com a utilização do ultrassom.

No tratamento realizado por Sindhu et al. (2012), observou-se que o ultrassom induziu a mudanças na biomassa. O bagaço de cana sem tratamento mostrou ter uma estrutura compacta e ordenada, enquanto que o bagaço de cana com tratamento ultrassônico e utilização de surfactante mostrou ter uma estrutura distorcida. Isso indicou que o tratamento com ultrassom removeu algumas das fibras externas pela destruição da rede de celulose-hemicelulose-lignina. A sonicação não hidrolisa a biomassa a açúcares, mas gera uma biomassa pré-tratada que é mais facilmente hidrolisada pelo aumento da área superficial.

Seino et al. (2001) observou que a irradiação ultrassônica de 23-45 kHz aumenta a porosidade da fibra de celulose e a clivagem das ligações α-O-4 ou β-O-4 na lignina. Durante o processo de sonicação, há o choque do substrato lignocelulósico devido às ondas geradas pela cavitação. Isso aumentará a área de superfície, aumentando a hidrólise enzimática.

4.8 Cinética de hidrólise enzimática utilizando GLP como fluido pressurizado e ultrassom

Após a realização do planejamento de experimentos com reações com 4 horas de duração, buscou-se realizar reações com variações de tempo, de 15 minutos a 8 horas. Foram selecionadas as condições dos ensaios 7, 8 e 9, visto que foram obtidos bons resultados nessas condições, com e sem o uso de ultrassom.

Foi analisada a quantidade de ART do bagaço sem nenhum tratamento, chamado de branco. A extração dos açúcares redutores totais foi realizada de acordo com o item 3.7 de Material e Métodos. Foi realizada a leitura de 10 amostras e obtido um valor médio de ART de 0,1538 g/g de bagaço.

O máximo valor de ART alcançado com as cinéticas foi de 0,2477 g/g de bagaço, obtido no experimento 8 (sem ultrassom), no tempo de 8 horas de reação. Nessa condição, foram utilizados 10% de enzima, 80% de umidade do bagaço de cana, e pressão de 200 bar.

Além disso, percebe-se de acordo com a Tabela 4.9, que a utilização do ultrassom na reação de hidrólise acelerou o início da reação, o que pode ser observado pelos valores maiores de ART no experimento 9, com ultrassom. Em contrapartida, a sua utilização não foi eficiente para alcançar um conteúdo maior de ART hidrolisado pela reação, onde o máximo valor encontrado foi muito semelhante às mesmas condições, porém sem a utilização do mesmo (Ponto central, sem utilização de ultrassom).

Tabela 4.9– Valores de açúcares redutores totais para as cinéticas de hidrólise enzimática do bagaço de cana com GLP pressurizado.

Tempo (h)	ART Experimento 7*	ART Experimento 8*	ART Experimento 9 (ponto central)*	ART Experimento 9 (ponto central)**
0	0,1538	0,1538	0,1538	0,1538
0,25	0,1563	0,1688	0,1632	0,1680
0,5	0,1610	0,1702	0,1708	0,1840
1	0,1697	0,1791	0,1733	0,1798
2	0,1646	0,1862	0,1799	0,1870
4	0,1713	0,2027	0,2077	0,2007
6	0,1764	0,2350	0,2169	0,2059
8	0,2007	0,2477	0,2191	0,2189

* Sem a utilização de ultrassom; ** Com a utilização de ultrassom.

Verifica-se, também, a importância da umidade do bagaço de cana na reação de hidrólise a alta pressão, analisando os dados referentes aos ensaios 7 e 8, que diferem na quantidade de água adicionada ao bagaço de cana (2 e 10%, valores

mínimo e máximo testados). De acordo com Kim e Hong (2001), o conteúdo de umidade é uma variável importante na hidrólise, pelo contato entre o dióxido de carbono e a água resultarem na formação de ácido carbônico, o qual age como catalisador, tendo a capacidade de realizar hidrólises envolvendo ácidos juntamente com os carboidratos do bagaço de cana.

A Figura 4.13 ilustra as cinéticas de hidrólise enzimática realizadas com GLP pressurizado e ultrassom.

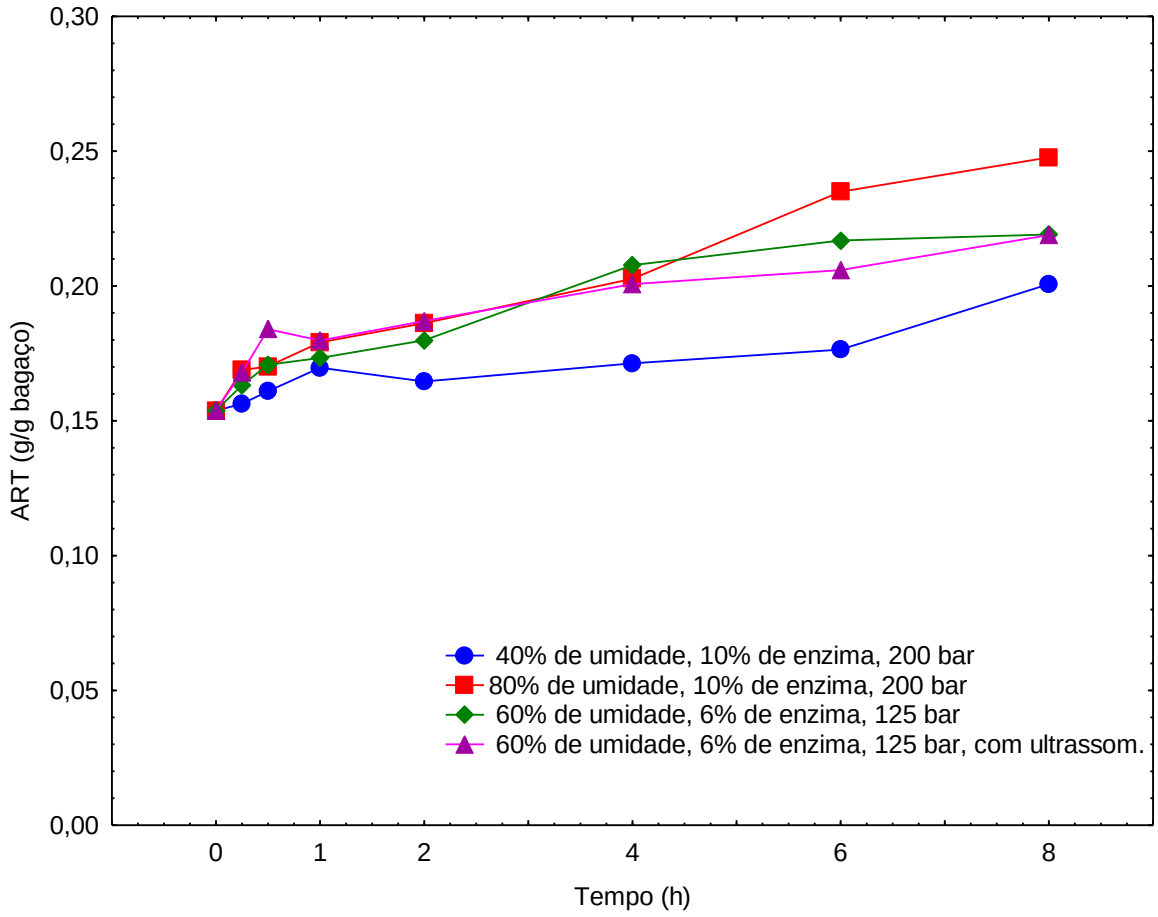


Figura 4.13– Cinética da hidrólise enzimática utilizando GLP como fluido pressurizado e ultrassom.

4.9 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar à pressão ambiente

A tabela a seguir contém os resultados em açúcares redutores totais para os experimentos realizados apenas utilizando o ultrassom, sem fluido pressurizado.

Neste planejamento, onde os experimentos foram realizados utilizando somente o banho termostático e/ou ultrassônico, a condição que levou a uma maior quantidade de ART/g de bagaço foi o experimento 4, que consistia de 80% de umidade no bagaço, e 10% de enzima em relação à quantidade de bagaço. Isso predominou em ambos os casos – com ou sem a utilização de ultrassom. Com exceção do experimento 1, que teve um leve aumento no teor de ART com a utilização de ultrassom, em todos os outros foi conseguido um melhor resultado sem a utilização do mesmo.

Tabela 4.10 – Planejamento de experimentos realizado (valores codificados e reais) bem como valores de açúcares redutores totais para a hidrólise do bagaço de cana utilizando a enzima celulase NS50013, com a utilização de ultrassom (154 W) e sem ultrassom.

Experimento	Umidade (%)	Enzima (%)	ART (g/g de bagaço) sem ultrassom	ART (g/g de bagaço) com ultrassom
1	40 (-1)	2 (-1)	0,1913	0,1936
2	80 (+1)	2 (-1)	0,2053	0,2026
3	40 (-1)	10 (+1)	0,2014	0,1909
4	80 (+1)	10 (+1)	0,2368	0,2274
5	60 (0)	6 (0)	0,2027	0,2000
6	60 (0)	6 (0)	0,2100	0,2080
7	60 (0)	6 (0)	0,2175	0,2109

Analisando o gráfico de Pareto da Figura 4.14, observa-se que a umidade e a enzima tiveram efeito significativo positivo, $p<0,05$, sem a utilização do ultrassom. Já na Figura 4.15, que trata da hidrólise com a utilização do ultrassom, apenas a umidade do bagaço de cana foi significativa, indicando que as maiores umidades levaram a um maior teor de ART.

Nesse planejamento, o maior rendimento, considerando a celulose total do bagaço de cana utilizado nesse trabalho de 0,3917 g/g, corresponde a 60,45%.

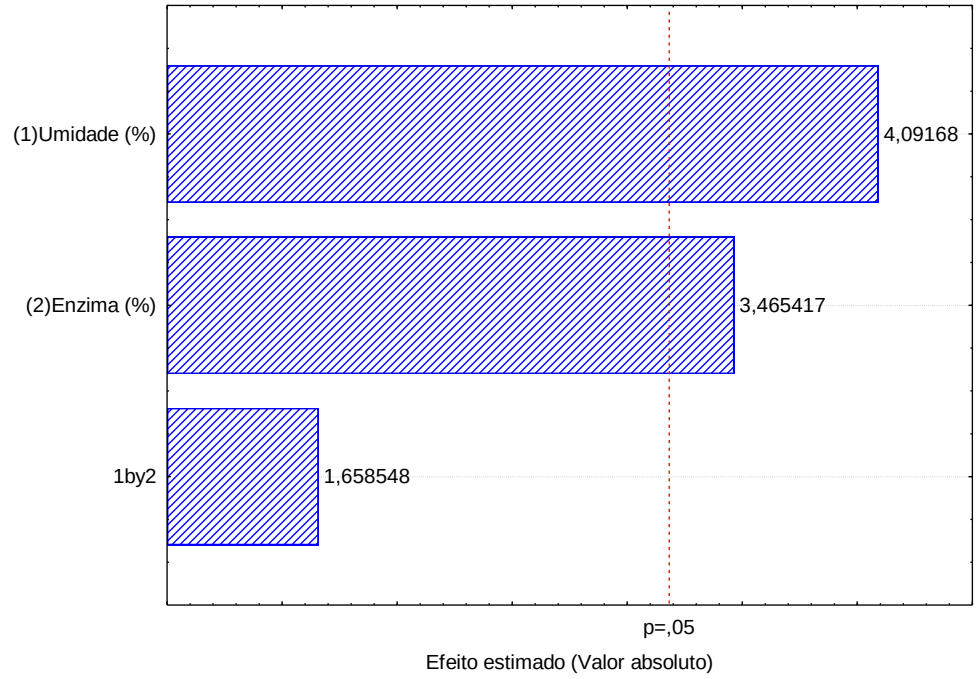


Figura 4.14– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana, p<0,05. Hidrólise enzimática do bagaço de cana a pressão ambiente, sem ultrassom.

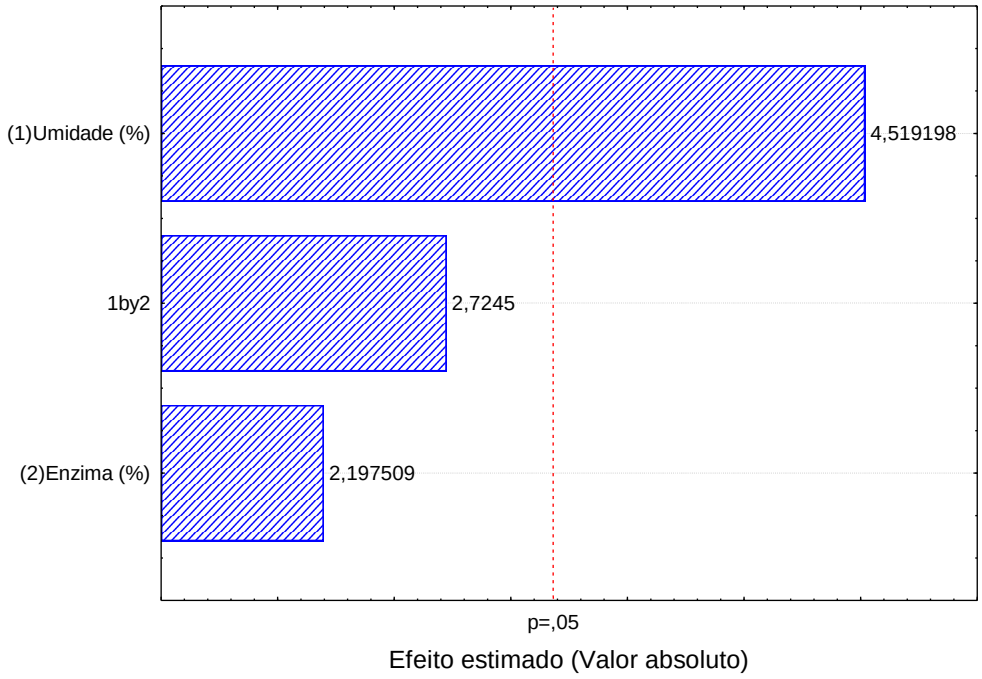


Figura 4.15– Gráfico de Pareto para as variáveis estudadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana, p<0,05. Hidrólise enzimática do bagaço de cana a pressão ambiente, com ultrassom.

Convém salientar que, primeiramente, nos ensaios a alta pressão para verificar o comportamento da enzima, era utilizada uma célula menor, com capacidade de 1mL de enzima (aproximadamente 1,03 g). Nos ensaios de hidrólise com bagaço de cana, a quantidade estudada de enzima consistia de 2% a 10%, com base na quantidade de material lignocelulósico que era adicionada à célula (2 gramas). Dessa forma, a quantidade de enzima estudada na primeira fase do trabalho era cerca de 4,6 vezes maior que na segunda fase do trabalho, e isso pode justificar o fato de a enzima não ser significativa na maioria dos experimentos realizados, ratificando os gráficos de Pareto, que sugeriram que uma quantidade maior de enzima levaria a um maior resultado em açúcares redutores por grama de bagaço.

4.10 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar

Esse experimento foi realizado a fim de comparar os rendimentos utilizando enzima e ácido. O resultado médio de ART/g de bagaço foi de 0,221±0,005, isso resulta numa eficiência calculada em termos de celulose de 46%, considerando a celulose total do bagaço de cana.

Esse resultado mostrou que obteve-se uma eficiência melhor de processo utilizando fluido pressurizado no meio reacional, com a vantagem de não se utilizar um ácido como catalisador da reação, eliminando as etapas subsequentes de neutralização da amostra e formação de compostos indesejáveis no processo.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Em vista da utilização de fluidos pressurizados como solventes em reações, foi realizado neste trabalho um estudo envolvendo a enzima celulase e gás liquefeito de petróleo como fluido pressurizado e em combinação com ultrassom, com o objetivo de verificar seu comportamento frente a este solvente, e posterior aplicação na hidrólise enzimática de bagaço de cana.

Através dos resultados obtidos nos efeitos das variáveis estabelecidas pelo estudo, algumas conclusões podem ser delineadas:

- A enzima xilanase obteve um ganho de atividade considerável com a utilização de ultrassom. No entanto, com a utilização de gás liquefeito de petróleo pressurizado combinado com ultrassom, houve uma perda de atividade em quase todas as condições estudadas.

- A atividade residual da enzima celulase NS50013 foi aumentada com a utilização de GLP como fluido pressurizado, no menor tempo, temperatura e pressão estudada;

- Com a utilização concomitante de ultrassom no processo, conseguiu-se um aumento pronunciado na atividade residual da enzima, com pressão de 270 bar e tempo de uma hora de reação;

- Com a temperatura e pressão fixadas no ponto central, e variando a potência do ultrassom, foram alcançadas atividades residuais máximas na menor e maior potência do equipamento. Isso foi corroborado pela cinética;

- Na hidrólise do bagaço de cana com GLP pressurizado, o melhor resultado foi obtido no experimento 8 (200 bar, 10% de enzima e 80% de umidade no bagaço), sem utilização do ultrassom. O rendimento da reação foi baixo (62,5 %), e a variável enzima não foi significativa no seu intervalo estudado;

- A cinética de hidrólise enzimática com a utilização de ultrassom levou ao início da reação mais rápida comparada às outras cinéticas;

- No geral, não houve grandes alterações nos resultados de ART/g nas condições estudadas, seja com fluido pressurizado, a pressão ambiente ou com hidrólise ácida;

- A variável umidade foi significativa em todos os ensaios realizados;

- O efeito da variável enzima foi significativo apenas no planejamento de experimentos realizado à pressão ambiente e sem ultrassom, provavelmente por ter sido utilizada em pequena quantidade.

5.2 Sugestões

A partir das conclusões obtidas, juntamente com observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, podem-se citar as seguintes sugestões para trabalhos futuros nesta área:

- O emprego de outras enzimas celulases com maior atividade;

- Utilização de outras enzimas que possuem papel importante na hidrólise, como a β-glucosidase;

- Avaliar o comportamento da celulase NS50013 com outros gases, como o dióxido de carbono.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*,** dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo/PR, 2010.

ALVES-PRADO, H.F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; DASILVA, R. **Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.161, n.1-8, p.333–346, 2010.

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

ANDRADE, J.M. **Efeito de dióxido de carbono e propano pressurizados na atividade catalítica de D-hidantoinase**, tese (doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ANDRADE, J.M.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; ANTUNES, O.A.C.; DARIVA, C. **Effect of treatment with compressed CO_2 and propane on D-hydantoinase activity.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 46, p. 342–350, 2008.

BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review**. Energy Conversion and Management, v. 52, p. 858–875, 2011.

BALSAN, G.; ASTOLFI, V.; BENAZZI, T.; MEIRELES, M.A.; MAUGERI, F.; DI LUCCIO, M.; DAL PRÁ, V.; MOSSI, A.J.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A.

Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial substrates. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 35, p. 1229–1237, 2012.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. **Ultrasom: influência do ultrassom na química.** Química Nova, v. 15, n.4, p. 302–316, 1992.

BARROS, R. R. O., OLIVEIRA, R. A., GOTTSCHALK, L. M. F., BON, E. P. S. **Production of cellulolytic enzymes by fungi *Acrophialophora nainiana* and *Ceratocystis paradoxa* using different carbon sources.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 161, n. 1–8, p. 448–454, 2010.

BARTON, S.; BULLOCK, C.; WEIR, D. **The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance.** Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 190–194, 1996.

BASHARI, M.; EIBAID, A.; WANG, J.; TIAN, Y.; XU, X.; JIN, Z. 2012. **Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase.** Ultrassonics Sonochemistry DOI 10.1016/j.ultsonch.2012.06.010.

BASTO, C.; SILVA, C.J.; GÜBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A. **Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 14, p. 355–362, 2007.

BATISTELLA, L.; USTRA, M.K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S.B.C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D. **Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 35, p. 351–358, 2012.

BATTISTELLE, R.A.G.; MARCILIO, C.; LAHR, F.A.R. **Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e das folhas caulinares do bambu da espécie *Dendrocalamus giganteus* na produção de chapas de partículas**. In "Revista Minerva – Pesquisa & Tecnologia", 5(3): p. 297–305, 2008. Disponível em <www.fipai.org.br>, Acesso em 26/01/2012.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S.; **Microbial xylanases and their industrial applications: a review**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 56, p. 326 – 338, 2001.

BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J.V.; MAZUTTI, M.A. **Hydrolysis of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide to obtain fermentable sugars.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, DOI: 10.1002/jctb.4002, 2012.

BENDER, J.P.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. **Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 149, n. 3, p., 195–203, 2008.

BEUKES, N.; PLETSCHKE, B.I. **Effect of lime pre-treatment on the synergistic hydrolysis of sugarcane bagasse by hemicellulases**. Bioresource Technology, v. 101, p. 4472–4478, 2010.

BHAT, M.K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnology Advances, v. 18, p. 355–383, 2000.

BIGAND, V.; PINELA, C.; PEREZB, D. S.; RATABOULA, F.; HUBERC, P.; PETIT-CONIB, M. **Cationisation of galactomannan and xylan hemicelluloses.** Carbohydrate Polymers, v. 85, p. 138–148, 2011.

BRETHAUER, S., WYMAN, C.E. **Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production.** Bioresource Technology, v. 101, p. 4862–4874, 2010.

BRUNNER, G. **Supercritical fluids: technology and application to food processing.** Journal of Food Engineering, v. 67, p. 21–33, 2005.

BUFFIERE, P.; LOISEL, D. **Dosage des fibres VAN SOEST**, Weened. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Narbonne, 1-14, 2007.

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

CARRILHO, E.; TAVARES, M.C.H.; LANÇAS, F.M. **Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos.** Química Nova, v. 24, n. 4, p. 509–515, 2001.

CERQUEIRA, D.A.; RODRIGUES, G.; MEIRELES, C.D. **Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation.** Carbohydrate Polymers, v. 69, p. 579–582, 2007.

CHEN, H.; QIU, W. **Key technologies for bioethanol production from lignocellulose.** Biotechnology Advances, v. 28, p. 556–562, 2010.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 59, p. 85–89, 2007.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases.** FEMS Microbiology Reviews, v. 29, p. 3–23, 2005.

CONDON, B.; EASSON, M.; YACHMENEV, V.; LAMBERT, A.; DELHOM, C.; SMITH, J. **Application of a low-level, uniform ultrasound field for the acceleration of enzymatic bio-processing of cotton.** Cellulose Chemistry and Technology, v. 43, n. 9–10, p. 443–453, 2009.

CORRAL, O. L.; VILASEÑOR-ORTEGA, F. **Xylanases.** Advances in Agricultural and Food Biotechnology, p. 305–322, 2006.Disponível em:

<www.trnres.com/ebook/uploads/gonzalezfinal/T_1231139053gonzalez%2014.pdf>. Acesso em 20 de dezembro de 2010.

CROCKER, M. **Thermochemical Conversion of Biomass to Liquid Fuels and Chemicals.**1st Edition. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 552 p, 2010.

CUYVERS, S.; DORNEZ, E.; MOERS, K.; POLLET, A.; DELCOUR, J.A.; COURTIN, C.M. **Evaluation of the xylan breakdown potential of eight mesophilic endoxylanases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 49, p. 305–311, 2011.

DAGNINO, E.P.; CHAMORRO, E.R.; ROMANO, S.D.; FELISSIA, F.E.; AREA, M.C. **Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production.** Industrial Crops and Products, v. 42, p. 363–368, 2013.

DIONISIO, G.F.; SANTANA, F.C.I.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison **of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry.** Talanta, v. 53, p. 433–441, 2000.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation of radish (*Raphanus sativus L.*) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 38, p. 347–353, 2006.

GARCÍA-APARICIO, M.P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J. **Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** Fuel, v. 90, p. 1624–1630, 2011.

GAUDER, M.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; CLAUPEIN, W. **The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil.** Applied Energy, v. 88 p. 672–679, 2011.

GE, L., WANG, P., MOU, H. **Study on saccharification techniques of sea weed wastes for the transformation of ethanol.** Renewable Energy, v. 36, p. 84–89, 2011.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulose activities.** Pure & Applied Chemistry, v. 59, Nº.2, p. 257-268, 1987.

GOTTSCHALK, L.M.F., OLIVEIRA, R.A., BON, E.P.S. **Cellulases, xylanases, β-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse**. Biochemical Engineering Journal, v. 51, p. 72-78, 2010.

HABULIN, M.; PRIMOZI, M.; KNEZ, Z. **Stability of proteinase form *Carica papaya* latex in dense gases**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 33, p. 27–34, 2005.

HE, D.; BAO, L.; LONG, Y.; WEI, W.; YAO, S. **A new study of the enzymatic hydrolysis of carboxymethylcellulose with a bulk acoustic wave sensor**. Talanta, v. 50, p. 1267-1273, 2000.

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

HOWARD, R.L., ABOTSI E., JANSEN VAN RENSBURG E.L., HOWARD S. **Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.** African Journal of Biotechnology, v. 2 (12), p. 602-619, 2003.

HUBBELL, C.A.; RAGAUSKAS, A.J. **Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization.** Bioresource Technology, v. 101, p. 7410–7415, 2010.

JOHNS, M.K.; SMALLRIDGE, A.J.; TREWHELLA, M.A.**The use of liquefied petroleum gas (LPG) as a solvent for yeast reactions**. Tetrahedron Letters, v. 42, p. 4261–4262, 2001.

KAMAT, S.V.; BARRERA, J.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A.J. **Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: I. Optimization of enzyme environment.** Biotechnology and Bioengineering, v.40, p. 158–166, 1992.

KIM, K. H., HONG, J. **Supercritical CO_2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis.** Bioresource Technology, v. 77,139–144, 2001.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 14, p. 17–29, 1998.

KNEZ, Z. **Enzymatic reactions in dense gases.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 357–372, 2009.

KNUTSON, B.L., SARKARI, M. **Processing of biological materials.** In: YORK, P., KOMPELLA, U.B., SHEKUNOV, B.Y. **Supercritical fluid technology for drug product development.** Taylor & Francis e-Library, 2005, Cap.10, p. 383–425.

LANZA, M., PRIAMO, W.L., OLIVEIRA, J.V., DARIVA, C.E., OLIVEIRA, D.; **The effect of temperature, pressure, exposure time and depressurization rate on lipase activity in $SCCO_2$**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.113, p.181–188, 2005.

LEAES, E.X.; LIMA, D.; MIKLASEVICIUS, J.V.S.; RAMON, A.P.; DAL PRÁ, V.; BASSACO, M.M.; TERRA, L.M.; MAZUTTI, M.A. **Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α-amylase and amyloglucosidase.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.2, p. 21–25, 2013.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent free system.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 15, p. 402–407, 2008.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews,v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

LOPES, F.P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**, dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2010.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. **Thermostable xylanases from non-conventional yeasts.** Journal of Microbial and Biochemical Technology, v. 3, p. 36–42, 2011.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja,** dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. **Recent advances in cellulase technology**. Journal of Fermented Technology, v. 54, p. 267–286, 1976.

MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*,** dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2005.

MAZUTTI, M.A.; ZABOT, G. ; BONI, G. ; SKOWRONSKI, A. ; OLIVEIRA, D. ; DI LUCCIO, M. ; RODRIGUES, M.I. ; TREICHEL, H. ; MAUGERI, F. **Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor**. Food Chemistry, v. 120, p. 163–173, 2010.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; RUIZ, H.A.; VICENTE, A.A.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; TEIXEIRA, J.A. **Production of xylanase and β-xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v.35, p.1185–1192, 2012.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalisylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, p. 426–428, 1959.

Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/>.Acesso em 10/12/2010.

MONHEMIA, H.; HOUSAINDOKHT, M.R. **How enzymes can remain active and stable in a compressed gas? New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 72, p. 161–167, 2012.

MOTTA, F.B. **Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres,** dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2008.

MOURA, J.M.L.N.; RIBEIRO, A.P.B.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G. **Reator de membrana enzimático e fluidos supercríticos: associação de processos**. Química Nova, v. 30, n.4, p. 965–969, 2007.

National Renewable Energy Laboratory, 2000. Acesso em 20/12/2012, disponível em **<http://www.nrel.gov/research_review/pdfs/2003/36178.pdf>.**

NOORBATCHA, I.A.; WAESOHO, S; SALLEH, H.M. **Molecular dymanics studies of an endoglucanase from *Fusarium oxysporum*.** The 1st International Conference on Computation for Science and Technology, Chiang May, Thailand, p. 86–89, 2010.

NOORBATCHA, I.A.; WAESOHO, S; SALLEH, H.M. **Structural and dynamics behavior of native Endoglucanase from *Fusarium Oxysporum***. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(1), p. 89–92, 2012.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 38, p. 373–382, 2006.

OTIENO, D.O.; AHRING, B.K. **The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannooligosaccharides (MOS**). Carbohydrate Research, v. 360, p. 84–92, 2012.

PANDEY, A; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** Bioresource Technology, v. 74, p. 69–80, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification**. Bioresource Technology, v. 74, p.17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition**. Bioresource Technology, v. 74, p. 25–33, 2000b.

PALJEVAC, M.; PRIMOZIC, M.; HABULIN, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Z. **Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulose immobilized on silica gels at low and high pressures.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 43, p. 74–80, 2007.

PARK, S.; BAKER, J.O.; HIMMEL, M.E.; PARILLA, P.A.; JOHNSON, D.K. **Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance.** Biotechnology for Biofuels, p. 3–10, 2010.

PENEDO, P.L.M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO_2 supercrítico**, tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/ Acesso em 23/08/11.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 67, p. 577–591, 2005.

POLITZER, K.; BON, E.P.S. **Enzimas industriais e especiais**. Centro de Gestão e estudos estratégicos (CGEE), Rio de Janeiro, 2006.

PRIMO, M.S. **Efeito do processamento com CO_2 comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* st.hill),** dissertação (mestrado em Engenharia de alimentos), Universidade do alto Uruguai e Missões, Erechim, 2006.

Propriedades do bagaço da cana-de-açúcar. Edição impressa 30–04/1998.Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acesso em 10/12/2010.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**, tese (doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2010.

RABINOVICH, M.L.; MELNICK, M.S.; BOLOBOVA, A.V. **The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes.** Biochemistry (Moscow), v. 67, nº.8, p. 850–871, 2002.

RAMOS, L.P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.** Química Nova, v. 26, n.6, p. 863–871, 2003.

REID, R.C.; PRAUSNITZ J.M.; POLING B.E. **The properties of gases and liquids**, McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1988.

REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. **Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids.** Biotechnology Advances, v. 25,p. 272–280, 2007.

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art.** Trends in biotechnology, v. 27, p. 298–306, 2009.

SAHA, B.C. **Hemicellulose bioconversion.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 279–291, 2003.

SAKA, S., UENO, T. **Chemical conversion of various celluloses to glucose and its derivatives in supercritical water.** Cellulose, v. 6, p. 177–191, 1999.

SANTOS, A.L.F.; KAWASE, K.Y.F.; COELHO, G.L.V. **Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 56, p. 277–282, 2011.

SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A,M.; GOUVEIA, E.R. **Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae.*** Química Nova, v. 33, n.4, p. 904–908, 2010.

SASAKI, M., KABYEMELA, B., MALALUAN, R., HIROSE, S., TAKEDA, N., ADSCHIRI, T., ARAI, K. **Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water.** Journal of Supercritical Fluids, v. 13, p. 261–268, 1998.

SATYANARAYANA, K.G.; GUIMARÃES, J.L.; WYPYCH, F. **Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications.** Composites: Part A, v. 38, p. 1694–1709, 2007.

SEINO, T.; YOSHIOKA, A.; FUJIWARA, M.; CHEN, K.-L.; ERATA, T.; TABATA, M.; TAKAI, M. **ESR studies of radicals generated by ultrasonic irradiation of lignin solution. An application of the spin trapping method**. Wood Science Technology, v. 35, p. 97–106, 2001.

SILVA, M.F.; GOLUNSKI, S.M.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; PERGHER, S.B.C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H. **Liquefied petroleum gas as solvent medium for the treatment of immobilized inulinases.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.88, p. 280–286, 2013a.

SILVA, M.F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; GOLUNSKI, S.; KUHN, G.O.; DI LUCCIO, M.; DALLAGO, R.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H. **Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and**

Kluyveromyces marxianus **NRRL Y-7571 in aqueous–organic medium.** Food Chemistry, v.138, p. 148–153, 2013b.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; PREETI, V.E.; VANI, S.; SUKUMARAN, R.K.; BINOD, P.**A novel surfactant-assisted ultrasound pretreatment of sugarcane tops for improved enzymatic release of sugars.** Bioresource Technology, 2012.

SOARES, I.B.; TRAVASSOS, J.A.; BAUDEL, H.M.; BENACHOUR, M.; ABREU, C.A.M. **Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse.** Industrial Crops and Products, v. 33, p. 670–675, 2011.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, M. A.; TORRES, F. A. G. **Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil.** Bioresource Technology, v. 101, pg. 4820-4825, 2010.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica.** John Willey & Sons, Inc. 1996.

SONG, J.M.; WEI, D.Z. **Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9**. Biomass and bioenergy, v. 34, p. 1930–1934, 2010.

SOUZA, M.; MEZADRI, E.T.; ZIMMERMAN, E.; LEAES, E.X.; BASSACO, M.M.; DAL PRÁ, V.; FOLETTO, E.L.; CANCELIER, A.; TERRA, L.M.; JAHN, S.L.; MAZUTTI, M. A. **Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 20, p. 89–94, 2013.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 22 (1), p. 33–46, 2002.

SULAIMAN, A. Z. B., AJIT, A., YUNUS, R. B. M., CHISTI, Y. **Effects of ultrasound on enzymatic hydrolysis of soluble cellulose.** Special Abstracts / Journal of Biotechnology, v. 150S, p. S135, 2010.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. **Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse.** Polymer Degradation and Stability, v. 84, p. 331–339, 2004.

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. **Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.** Biomass and Bioenergy, v 10, n.5/6, p. 367–375, 1996.

TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. **Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review**. BioResources (2), v. 3, p. 472–499,2007a.

TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. **Enzime-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review.** BioResources (2), v. 4, p. 707–738, 2007b.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; MASANORI, W.; SASAKI, K. **Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review**. Process Biochemistry, v.38, p. 1327–1340, 2003.

TERRASAN, C.R.F.; TEMER, B.; DUARTE, M.C.T.; CARMONA, E.C**.Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*.** Bioresource Technology, v.101, p.4139–4143, 2010.

THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. **An acidic and thermostable carboxymethylcellulase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell density fermentation of *Pichia pastoris***. Protein Expression and Purification, v. 60, p.140–146, 2008.

UM, B.H.; WALSUN, G.P. **Evaluation of enzyme mixtures in releasing fermentable sugars from pre-pulping extracts of mixed Northeast hardwoods.** Applied Biochemistry Biotechnology, v. 161, p. 432–444, 2010.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em <www.unica.com.br> Acesso em 26/01/2012.

USMA-GUEZ, M.A.; ORY, A.B.D.I.; BLANDINO, A.; GOMES, E.; CARO, I. **Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, p. 1585–1597, 2011.

WANDERLEY, M.C.A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G.J.M.; GOUVEIA, E.R. **Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis.** Bioresource Technology, v. 128, p.448-453, 2013.

WANG, J.; CAO, Y.; BAOGUO S.; WANG, C.; MO, Y. **Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic.** Ultrasonics Sonochemistry, v.18, p. 534–540, 2011.

WIMMER, Z.; ZAREVÚCKA, M. **A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity.** International Journal of Molecular Sciences, v.11, p. 233–253, 2010.

YACHMENEV, V., CONDON, B., KLASSON, T., LAMBERT, A. **Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound.** Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v.3, p. 25–31, 2009.

YANG, L.; CAO, J.; JIN, Y.; CHANG, H.; JAMEEL, H.; PHILLIPS, R.; LI, Z. **Effects of sodium carbonate pretreatment on the chemical compositions and enzymatic saccharification of rice straw.** Bioresource Technology, v.124, p. 283-291, 2012.

YASUDA, K.; KATO, D.; XU, Z.; SAKKA, M.; SAKKA, K. **Effect of Ultrasonic Frequency on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose.** Japanese Journal of Applied Physics, v. 49, p. 07–08, 2010.

ANEXO A

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR VAN SOEST

Este procedimento foi baseado na norma padrão “Dosage des fibres VAN SOEST, Weened” desenvolvida pelo INRA, Narbonne (BUFFIERE e LOISEL, 2007). O objetivo é determinar as componentes da parede celular através do método sequencial de VAN SOEST.

1. Preparo dos reagentes

Para determinação dos componentes do material lignocelulósico foram utilizados sacos de nylon da marca GERHARDT e soluções detergente e ácida, cuja descrição é apresentada a seguir.

Solução detergente neutra (FDN)

Reagentes	Massa (g)
Dodecil sulfato de sódio	30
Tetraborato de sódio	6,81
EDTA	18,61
Hidrogeno fosfato de sódio penta hidratado	4,56

Os sais foram dissolvidos em água destilada e aquecidos suavemente para promover a dissolução. Quando necessário, o pH da solução foi ajustado para 6,9 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, tendo ao final o volume aferido para 1,0 L.

Solução detergente ácida (FDA)

Reagentes	Quantidade
Brometo de hexadeciltrimetilamônio	20,0 g
Ácido sulfúrico 96%	28,8 mL

Os compostos foram dissolvidos em água destilada e transferidos para um balão volumétrico que teve seu volume aferido para 1,0 L com água destilada.

Solução de ácido sulfúrico

Para a análise da componente lignina, foi utilizado uma solução de ácido sulfúrico 72%.

2. Procedimento

Obtenção da fração FDN

Os sacos e béqueres utilizados foram previamente secos a 105 °C por 24 h. Após secagem e transferência para um dessecador até temperatura ambiente, os béqueres (T) e os sacos (TS) foram pesados e tiveram suas massas anotadas.

Aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi inserido dentro do saco que foi novamente pesado juntamente com o béquer (MI). (Cada amostra teve a matéria seca e orgânica determinada anteriormente como descrito no apêndice XIII).

Cada saco, devidamente preenchido pela amostra e prensado por um bastão de vidro, foi colocado no carrossel de metal e inserido dentro de um béquer contendo 360 mL de solução de FDN e esferas de vidro previamente aquecidas a 100°C.

Após 1 h de reação, os sacos foram submetidos a três lavagens com água destilada quente durante cinco minutos, quando então foram retirados, escorridos e deixados imersos em acetona por três a cinco minutos. A secagem dos sacos foi realizada dentro do béquer previamente pesado em estufa de ar forçado a 105ºC por 24 horas.

Em seguida, após, atingirem a temperatura ambiente, estes foram novamente pesados (amostra + saco + béquer) tendo a massa anotada (M1).

Obtenção da fração FDA

Após secagem depois da análise com FDN, os sacos foram novamente transferidos para o carrossel sendo inseridos em um béquer contendo 360 mL da solução FDA sendo mantida sob aquecimento por 1 h.

Após este intervalo, os sacos foram submetidos a três lavagens com água destilada quente durante cinco minutos, quando então foram retirados, escorridos e deixados imersos em acetona por três a cinco minutos. A secagem dos sacos foi realizada dentro do mesmo béquer utilizado na análise anterior, em estufa de ar forçado a 105ºC por 24 horas.

Em seguida, após, atingirem a temperatura ambiente, estes foram novamente pesados (amostra + saco + béquer) tendo a massa anotada (M2).

Destruição ácida (AD)

Após análise da FDA, cada saco foi mergulhado em um frasco com tampa contendo 40 mL de ácido sulfúrico a 72%. As amostras reagiram por 3 horas sendo posteriormente lavadas com água destilada em abundância.

Os sacos foram então transferidos para os béqueres anteriormente pesados e colocados para secar em estufa de ar forçado a 105ºC por 24 horas, sendo posteriormente pesados (M3).

Após esta etapa, os béqueres foram transferidos para uma mufla a 550°C por 2 horas sendo posteriormente pesados após atingir a temperatura ambiente (M4).

3. Cálculos

Cálculo dos resíduos:

Foi utilizado um fator de correção para a massa do saco (99,2% da massa do saco é queimada durante a transição a 550°C).

$$FDN = \frac{M1-M4-0{,}992(TS-T)}{(MI-MS)*MS*MO} \quad (7)$$

$$FDA = \frac{M2-M4-0{,}992\ (TS-T)}{(MI-TS)*MS*MO} \quad (8)$$

$$AD = \frac{M3-M4-0{,}992\ (TS-T)}{(MI-TS)*MS*MO} \quad (9)$$

T: massa do béquer, em g

TS: massa do béquer + saco, em g

MI: massa do béquer + amostra + saco, em g

M1: massa após extração e secagem por FDN, em g

M2: massa após extração e secagem por FDA, em g

M3: massa após extração e secagem por AD, em g

M4: pesagem após a queima na mufla, em g

MO: matéria orgânica

MS: matéria seca

Cálculo das frações:

A partir dos resíduos, pode-se calcular as quantidades representadas de cada fração da biomassa:

Fração solúvel = 1-FDN

Hemicelulose = FDN-FDA

Celulose = FDA-AD

Lignina = AD

ANEXO B

ARTIGO PUBLICADO PELO PERIÓDICO BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY